

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Commissioner
US Department of Commerce
United States Patent and Trademark
Office, PCT
2011 South Clark Place Room
CP2/5C24
Arlington, VA 22202
ETATS-UNIS D'AMERIQUE
en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 08 mars 2001 (08.03.01)	
Demande internationale no PCT/FR00/02076	Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 00/0696
Date du dépôt international (jour/mois/année) 19 juillet 2000 (19.07.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 20 juillet 1999 (20.07.99)
Déposant WAHBI, Kamal etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:

☒ dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

08 décembre 2000 (08.12.00)

☐ dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection ☒ a été faite

☐ n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Kiwa Mpay no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	---

TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

(article 18 et règles 43 et 44 du PCT)

Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 00/0696	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport de recherche internationale (formulaire PCT/ISA/220) et, le cas échéant, le point 5 ci-après	
Demande internationale n° PCT/FR 00/ 02076	Date du dépôt international (jour/mois/année) 19/07/2000	(Date de priorité (la plus ancienne) (jour/mois/année) 20/07/1999
Déposant: INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE		

Le présent rapport de recherche internationale, établi par l'administration chargée de la recherche internationale, est transmis au déposant conformément à l'article 18. Une copie en est transmise au Bureau international.

Ce rapport de recherche internationale comprend 3 feuilles.

☒ Il est aussi accompagné d'une copie de chaque document relatif à l'état de la technique qui y est cité.

1. Base du rapport

a. En ce qui concerne la **langue**, la recherche internationale a été effectuée sur la base de la demande internationale dans la langue dans laquelle elle a été déposée, sauf indication contraire donnée sous le même point.

☐ la recherche internationale a été effectuée sur la base d'une traduction de la demande internationale remise à l'administration.

b. En ce qui concerne **les séquences de nucléotides ou d'acides aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), la recherche internationale a été effectuée sur la base du listage des séquences :

☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.

☒ déposée avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.

☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.

☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences présenté par écrit et fourni ultérieurement ne vas pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.

☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous forme déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences présenté par écrit, a été fournie.

2. ☐ **Il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche** (voir le cadre I).

3. ☐ **Il y a absence d'unité de l'invention** (voir le cadre II).

4. En ce qui concerne le **titre**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant.

☐ Le texte a été établi par l'administration et a la teneur suivante:

5. En ce qui concerne l'**abrégé**,

☒ le texte est approuvé tel qu'il a été remis par le déposant

☐ le texte (reproduit dans le cadre III) a été établi par l'administration conformément à la règle 38.2b). Le déposant peut présenter des observations à l'administration dans un délai d'un mois à compter de la date d'expédition du présent rapport de recherche internationale.

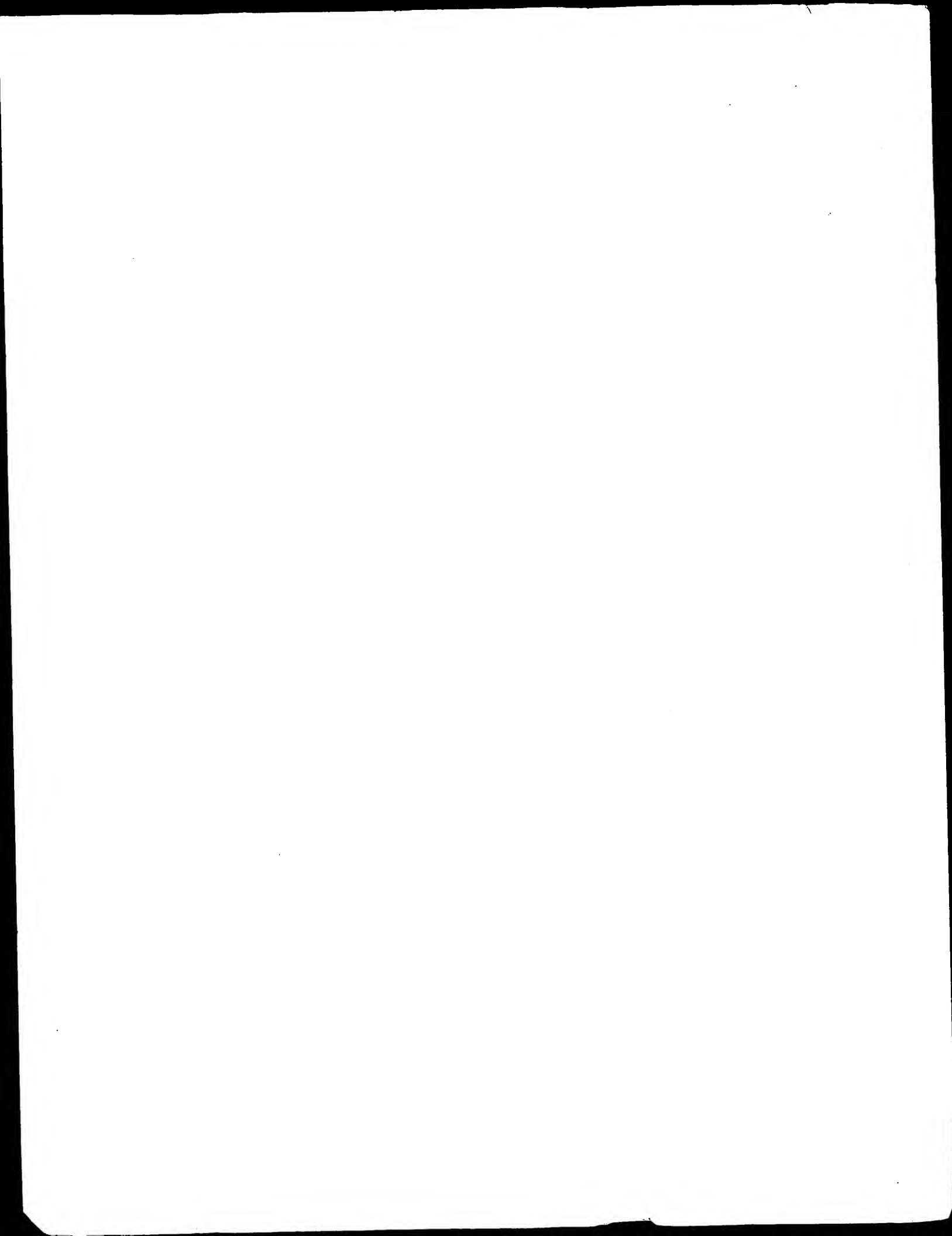
6. La figure **des dessins** à publier avec l'abrégé est la Figure n°

☐ suggérée par le déposant.

☐ parce que le déposant n'a pas suggéré de figure.

☐ parce que cette figure caractérise mieux l'invention.

☒ Aucune des figures n'est à publier.



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

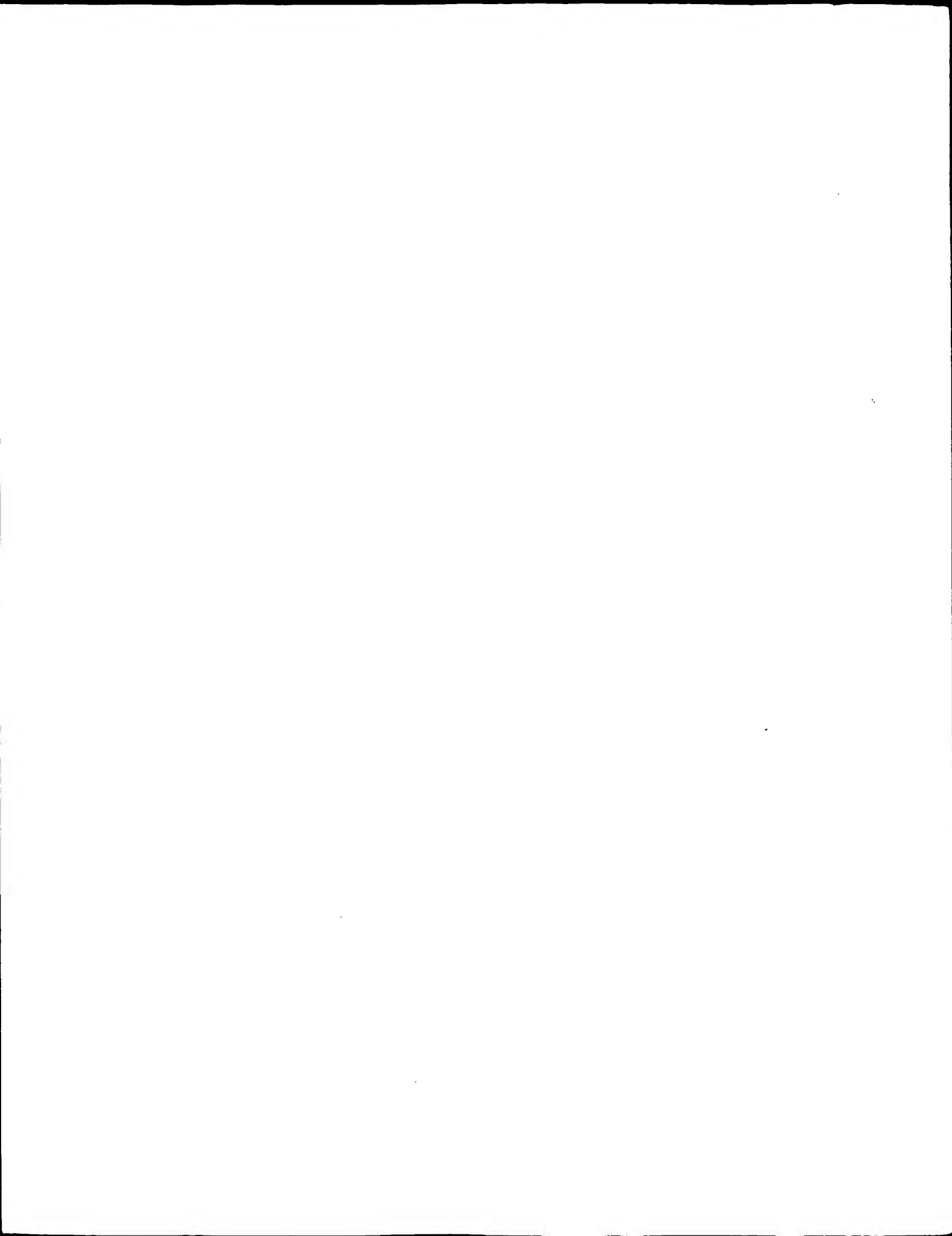
Demande internationale No

PCT/FR 00/02076

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12N15/12 C12N15/11 C12Q1/68 C07K14/47 C07K16/18 A61K38/17 A61K48/00 G01N33/53					
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB					
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07K C12N C12Q A61K G01N					
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche					
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, STRAND					
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS					
Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents				no. des revendications visées
X	✓ WO 89 06241 A (INST NAT SANTE RECH MED) 13 juillet 1989 (1989-07-13) citée dans la demande revendications 1-14; exemples 1-4 ---				1-13
X	✓ HILLIER ET AL.: "The WashU-Merck EST Project" EMBL DATABASE, ACC NO: H54590, 22 septembre 1995 (1995-09-22), XP002136341 abrégé ---				1-13
X	✓ HILLIER ET AL.: "Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags" EMBL DATABASE, ACC NO: AA142922, 14 décembre 1996 (1996-12-14), XP002136342 abrégé ---				1-13
-/--					
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>					
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>° Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*Z* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>					
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée			Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale		
20 décembre 2000			28/12/2000		
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale			Fonctionnaire autorisé		
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016			van Klompenburg, W		

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>✓ WANG ET AL.: "ArgBP2, a multiple Src Homology 3 domain-containing, Arg/Abl-interacting protein, is phosphorylated in v-Abl-transformed cells and localized in stress fibers and cardiocytic Z-disks"</p> <p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 28, 11 juillet 1997 (1997-07-11), pages 17542-17550, XP002136343</p> <p>page 17545, colonne 1; figure 1</p> <p>-& WANG ET AL.: "Homo sapiens Arg/Abl-interacting protein ArgBP2 mRNA"</p> <p>EMBL DATABASE ACC NO: AF049885, 16 mars 1998 (1998-03-16), XP002136344 abrégé</p>	1-13
X	<p>✓ WO 99 22243 A (ENDRESS GREGORY A ; FLORENCE KIMBERLY A (US); HUMAN GENOME SCIENCES) 6 mai 1999 (1999-05-06)</p> <p>SEQ ID NO: 60</p> <p>revendications 1-23</p>	1-13
X	<p>✓ WO 99 06548 A (LACROIX BRUNO ; DUCLERT AYMERIC (FR); GENSET (FR); DUMAS MILNE EDWA) 11 février 1999 (1999-02-11)</p> <p>SEQ ID NO: 178</p> <p>revendications 1-37</p>	1-13
X	<p>✓ WO 99 06553 A (LACROIX BRUNO ; DUCLERT AYMERIC (FR); GENSET (FR); DUMAS MILNE EDWA) 11 février 1999 (1999-02-11)</p> <p>SEQ ID NO: 159</p> <p>revendications 1-37</p>	1-13



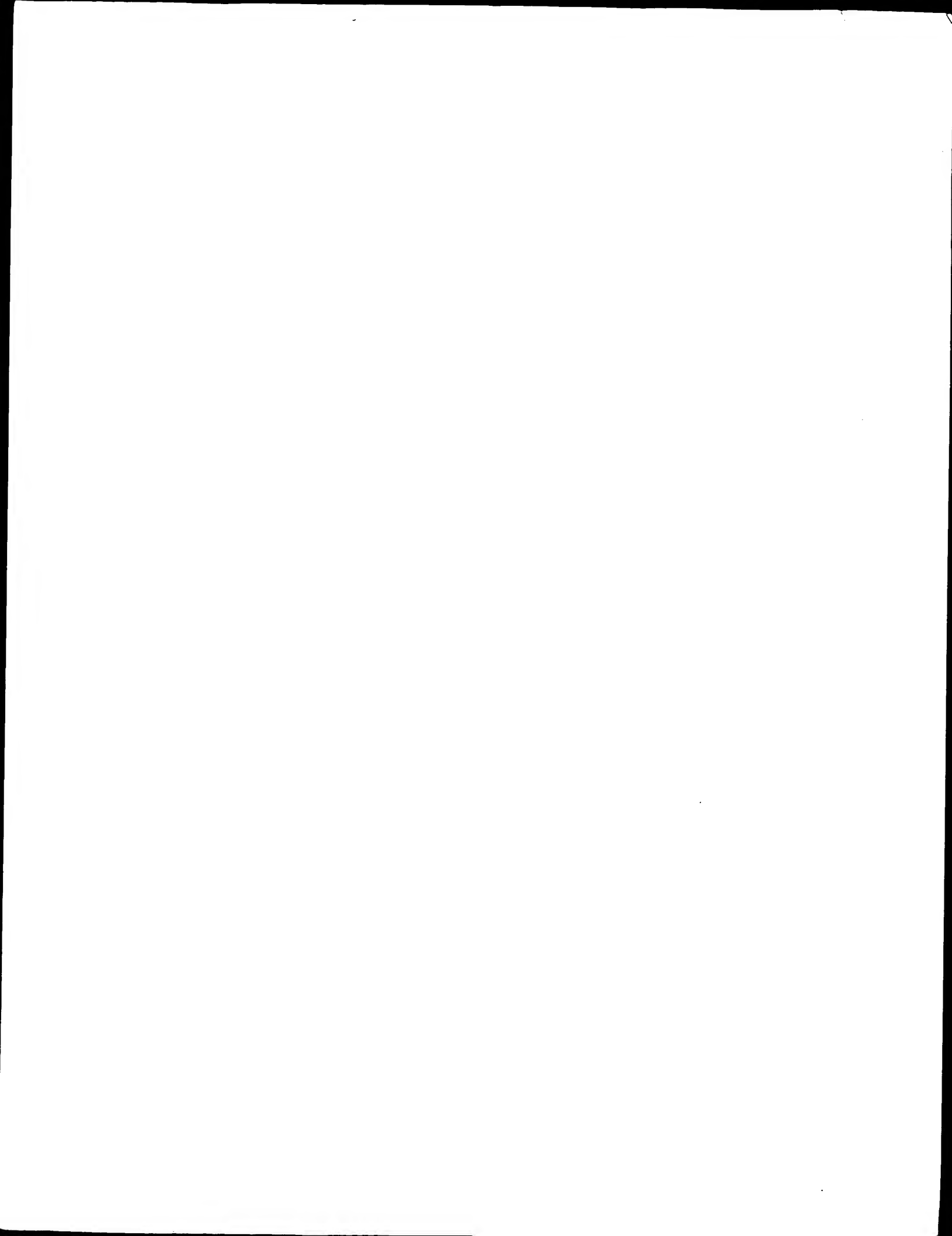
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/02076

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8906241	A	13-07-1989	FR 2601020 A	08-01-1988
			AT 82754 T	15-12-1992
			DE 3876240 D	07-01-1993
			DE 3876240 T	03-06-1993
			EP 0348399 A	03-01-1990
WO 9922243	A	06-05-1999	AU 1273499 A	17-05-1999
			EP 1042674 A	11-10-2000
			AU 1118499 A	17-05-1999
			WO 9921575 A	06-05-1999
WO 9906548	A	11-02-1999	AU 8554798 A	22-02-1999
			EP 1000146 A	17-05-2000
WO 9906553	A	11-02-1999	AU 8555698 A	22-02-1999
			EP 1000151 A	17-05-2000



CANADA

The applicant requests that, until either a Canadian patent has been issued on the basis of an application or the application has been refused, or is abandoned and no longer subject to reinstatement, or is withdrawn, the Commissioner of Patents only authorizes the furnishing of a sample of the deposited biological material referred to in the application to an independent expert nominated by the Commissioner, the applicant must, by a written statement, inform the International Bureau accordingly before completion of technical preparations for publication of the international application.

NORWAY

The applicant hereby requests that the application has been laid open to public inspection (by the Norwegian Patent Office), or has been finally decided upon by the Norwegian Patent Office without having been laid open inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. The request to this effect shall be filed by the applicant with the Norwegian Patent Office not later than at the time when the application is made available to the public under Sections 22 and 33(3) of the Norwegian Patents Act. If such a request has been filed by the applicant, any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on the list of recognized experts drawn up by the Norwegian Patent Office or any person approved by the applicant in the individual case.

AUSTRALIA

The applicant hereby gives notice that the furnishing of a sample of a microorganism shall only be effected prior to the grant of a patent, or prior to the lapsing, refusal or withdrawal of the application, to a person who is a skilled addressee without an interest in the invention (Regulation 3.25(3) of the Australian Patents Regulations).

FINLAND

The applicant hereby requests that, until the application has been laid open to public inspection (by the National Board of Patents and Regulations), or has been finally decided upon by the National Board of Patents and Registration without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art.

UNITED KINGDOM

The applicant hereby requests that the furnishing of a sample of a microorganism shall only be made available to an expert. The request to this effect must be filed by the applicant with the International Bureau before the completion of the technical preparations for the international publication of the application.

Page 2**DENMARK**

The applicant hereby requests that, until the application has been laid open to public inspection (by the Danish Patent Office), or has been finally decided upon by the Danish Patent office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. The request to this effect shall be filed by the applicant with the Danish Patent Office not later than at the time when the application is made available to the public under Sections 22 and 33(3) of the Danish Patents Act. If such a request has been filed by the applicant, any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Danish Patent Office or any person by the applicant in the individual case.

SWEDEN

The applicant hereby requests that, until the application has been laid open to public inspection (by the Swedish Patent Office), or has been finally decided upon by the Swedish Patent Office without having been laid open to public inspection, the furnishing of a sample shall only be effected to an expert in the art. The request to this effect shall be filed by the applicant with the International Bureau before the expiration of 16 months from the priority date (preferably on the Form PCT/RO/134 reproduced in annex Z of Volume I of the PCT Applicant's Guide). If such a request has been filed by the applicant any request made by a third party for the furnishing of a sample shall indicate the expert to be used. That expert may be any person entered on a list of recognized experts drawn up by the Swedish Patent Office or any person approved by a applicant in the individual case.

NETHERLANDS

The applicant hereby requests that until the date of a grant of a Netherlands patent or until the date on which the application is refused or withdrawn or lapsed, the microorganism shall be made available as provided in the 31F(1) of the Patent Rules only by the issue of a sample to an expert. The request to this effect must be furnished by the applicant with the Netherlands Industrial Property Office before the date on which the application is made available to the public under Section 22C or Section 25 of the Patents Act of the Kingdom of the Netherlands, whichever of the two dates occurs earlier.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/22376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) : Please See Extra Sheet.

US CL : Please See Extra Sheet.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 536/23.5, 23.1; 435/320.1, 440, 252.3, 69.1, 7.1; 530/350, 387.1; 514/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Please See Extra Sheet.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	ADAMS et al. Complementary DNA sequencing: Expressed sequence tags and the human genome project. Science. 21 June 1991, Vol. 252, pages 1651-1656, see entire document.	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
E earlier document published on or after the international filing date	*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	*g* document member of the same patent family
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
13 JANUARY 1999

Date of mailing of the international search report

03 FEB 1999

Name and mailing address of the ISA/US
Commissioner of Patents and Trademarks
Box PCT
Washington, D.C. 20231
Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

JAMES MARTINELL

Telephone No. (703) 308-0196

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US98/22376

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: 23
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claim 23 is directed to a product of the process of claim 20. claim 20 is not a process for the production of a product, but a process for the detection of a substance. hence, no meaningful search can be carried out.
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US98/22376

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

IPC (6):

G01N 33/68, 33/53; C07K 16/00; C12N 15/11, 15/12, 15/00, 15/63; A61K 38/17, 38/16; C12P 21/02

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

US CL :

536/23.5, 23.1; 435/320.1, 440, 252.3, 69.1, 7.1; 530/350, 387.1; 514/12

B. FIELDS SEARCHED

Electronic data bases consulted (Name of data base and where practicable terms used):

APS, STN, MPSRCH (SEQ ID NOs 11 and 160 only). One nucleotide sequence and one amino acid sequence have been searched. It is not clear which sequences are embraced by the claims because the claims refer to sequences X and Y. The table beginning after page 209 contains many sequences X and Y, yet the claims refer to X and Y in the singular. If the claims are to embrace more than one X and more than one Y, it is not clear whether each X always requires the corresponding sequence Y. Additionally, the claims are in improper format in referring to the description (see PCT Rule 6.2(a)). Accordingly, the first X nucleotide sequence disclosed and the first Y amino acid sequence mentioned in the claims were searched.

Translation
10/03/1967

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

67

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference BET 00/0696	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/02076	International filing date (day/month/year) 19 July 2000 (19.07.00)	Priority date (day/month/year) 20 July 1999 (20.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/12		
Applicant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 3 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 08 December 2000 (08.12.00)	Date of completion of this report 14 November 2001 (14.11.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/02076

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description: _____, as originally filed
 pages _____ 1-40
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the claims: _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of 25 October 2001 (25.10.2001)
 pages _____ 1-13
- ☒ the drawings: _____, as originally filed
 pages _____ 1/5-5/5
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☒ the sequence listing part of the description: _____, as originally filed
 pages _____ 1-7
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.
 These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☒ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims. Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/FR 00/02076

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)

Claims

1-13

YES

Claims

NO

Inventive step (IS)

Claims

YES

Claims

1-13

NO

Industrial applicability (IA)

Claims

1-13

YES

Claims

NO

2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following documents:

D1: WO 89 06241 A (INST NAT SANTE RECH MED) 13 July 1989 (1989-07-13) cited in the application

D2: HILLIER ET AL.: 'The WashU-Merck EST Project' EMBL DATABASE; ACC NO: H54590, 22 September 1995 (1995-09-22), XP002136341

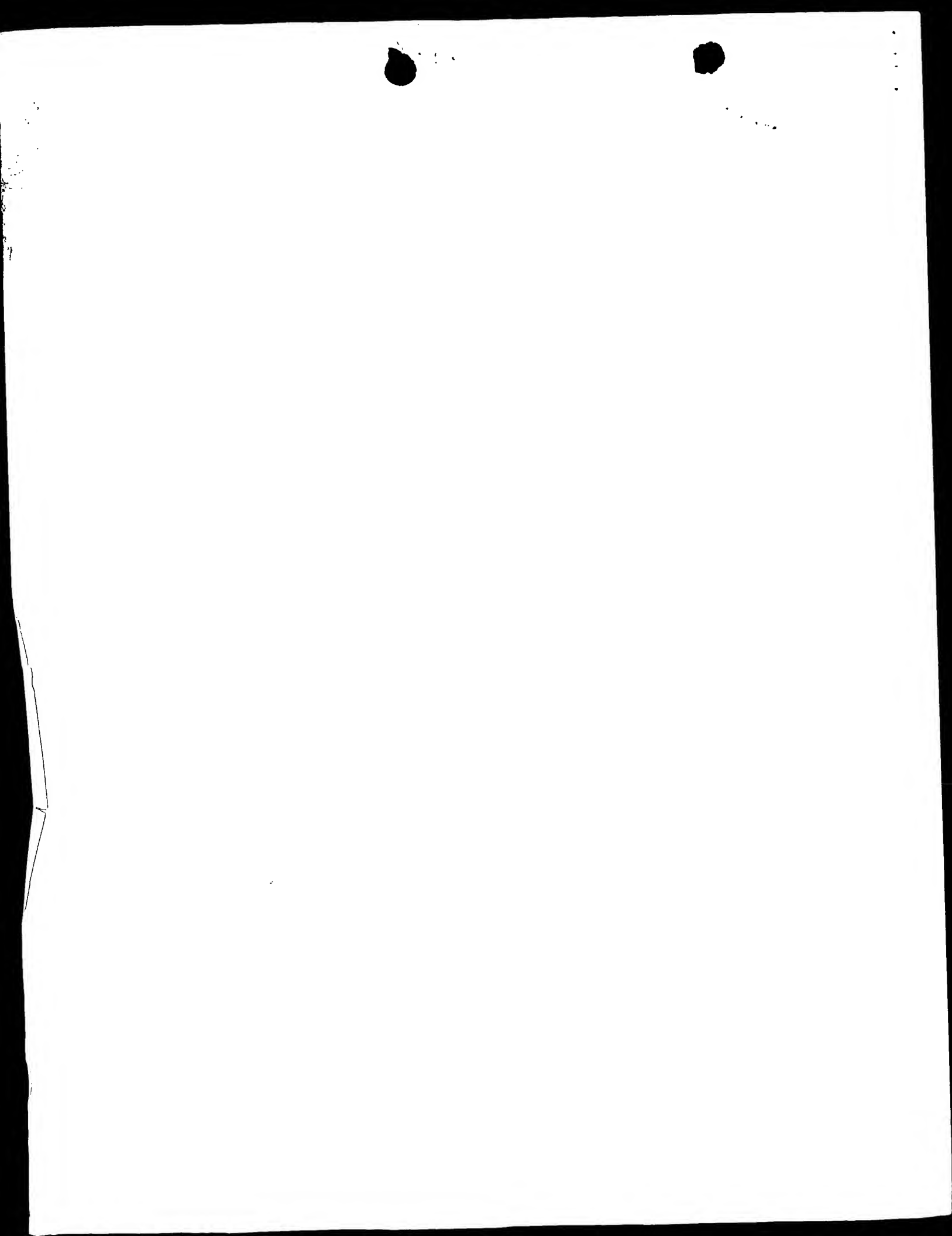
D3: HILLIER ET AL.: 'Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags' EMBL DATABASE, ACC NO: AA142922, 14 December 1996 (1996-12-14), XP002136342.

2. Document D1 discloses a purified polypeptide of porcine origin which has sorbin biological activity (Example 1, Claim 1) and the production method thereof. D1 also discloses a pharmaceutical composition which includes porcine sorbin and the possible use thereof in a therapeutic application (Example 4). Document D1 also shows the method for producing sorbin using genetic engineering (Example 3), even though the nucleotide sequences in question are not described.

3. The protein sequence of the porcine sorbin disclosed in D1 differs from SEQ ID No: 2 of the porcine sorbin of the present application by virtue of three amino acids in positions 16, 35 and 112. Since it is not possible to determine after the event whether these differences are the result of mutations or simple sequencing errors, the subject matter of Claims 6 and 7 is formally novel (PCT Article 33(2)).
4. The present application does not meet the requirements of PCT Article 33(3) concerning inventive step.

It appears obvious that a person skilled in the art aware of document D1 could have cloned the porcine and human sorbin gene, which corresponds to the subject matter of Claim 1 of the present application, and expressed the corresponding protein without exercising an inventive step (PCT Article 33(3)). This is particularly true since two EST fragments of the sorbin gene were known before the priority date of the present application, and the three amino acid difference between the known sequence and that of the present application has no surprising effect on the activity of sorbin.

The same objection applies to the subject matter of Claims 2 to 13.



(19) World Intellectual Property Organization

International Bureau

WIPO

(43) International publication date

25 January 2001 (25.01.2001)

PCT

(10) International publication number

WO 01/05966 A1

(51) International patent classification⁷: C12N 15/12, 15/11, C12Q 1/68, C07K 14/47, 16/18, A61K 38/17, 48/00, G01N 33/53

(21) International application number: PCT/FR00/02076

(22) International filing date: 19 July 2000 (19.07.2000)

(25) Language of filing: French

(26) Language of publication: French

(30) Data relating to the priority:
99/09,406 20 July 1999 (20.07.1999) FR

(71) Applicant (for all designated States except US): INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR). SOCIETE DE CONSEILS DE RECHERCHES ET D'APPLICATIONS SCIENTIFIQUES (SCRAS) [FR/FR]; 51/53, rue de Docteur Blanche, F-75016 Paris (FR).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (US only): WAHBI, Kamal [FR/FR]; 2141, Grande rue, F-01700 Miribel (FR). DESCROIX-VAGNE, Monique [FR/FR]; 5, ruelle de la Bussière, F-69450 Saint-Cyr-au-Mont-d'Or (FR). PANSU, Danielle [FR/FR]; 1352, route de Chilly, F-39570 Messia sur Sorne (FR).

(74) Representatives: JACOBSON, Claude etc.; Cabinet Lavoix, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).

(81) Designated states (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated states (regional): ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- With the International Search Report.
- Before expiry of the period provided for amending the claims, will be republished if such amendments are received.

For an explanation of the two-letter codes and the other abbreviations, reference is made to the explanations ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") at the beginning of each regular edition of the PCT Gazette.

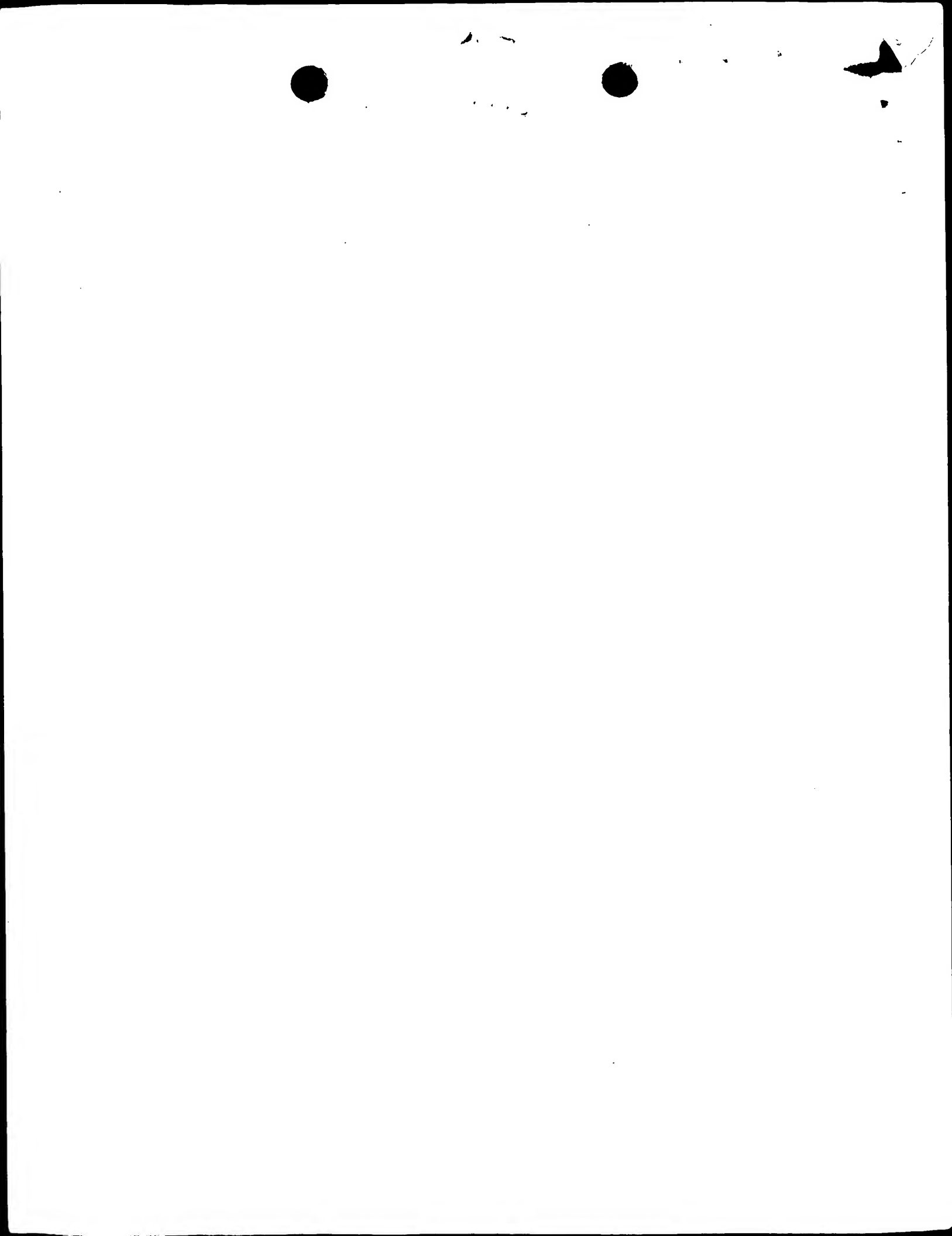
As printed

WO 01/05966 A1 (54) Title: NUCLEIC ACIDS CODING FOR PEPTIDES HAVING THE BIOLOGICAL ACTIVITY OF SORBIN

(54) Titre: ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR DES PEPTIDES POSSEDANT L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE LA SORBINE

(57) Abstract: The invention concerns nucleic acids coding for peptides having the biological activity of sorbin, the resulting coded peptides and their therapeutic uses, particularly the use of their properties on water and electrolyte cell absorption.

(57) Abrégé: Cette invention concerne les acides nucléiques codant pour des peptides possédant l'activité biologique de la sorbine, les peptides ainsi codés et leurs applications thérapeutiques, mettant notamment à profit leurs propriétés sur l'absorption cellulaire d'eau et d'électrolytes.



SEQUENCE LISTING

<110> INSERM
SCRAS

<120> nucleic acids encoding peptides having
the biological activity of sorbin

<130> EFF 98/555

<140>

<141>

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 474

<212> DNA

<213> pig

<400> 1

```
atgagagcag caacaccttt gcagacagtt gaccggcoga aggactggta caagaccatg 60
ttaaagcaaa tccacatggt gcacaagcca gatgatgaca cagacatgta taatactcct 120
tatacatata atgcaggect gtacaactca ccctacagtg ctcagtcaca tcctgctgcc 180
aagacccaga cctacagacc cctctccaaa agccactctg acaatggcac cgacgccttt 240
aaggatgctt cctcacctgt ccctccccc catgttcctc ctccagtcac acctctgcga 300
ccaagagatc ggtcttcaac agaaaagcat gactgggata ctccagacag aaaagtggac 360
acgagaaaat ttcgatcgga gccacggtct atttttgaat acgagcctgg gaagtcaccc 420
atcctgcagc acgaacgacc cgtcagcaaa ccgcaagcag ggcgccgtaa ggctc 474
```

<210> 2

<211> 153

<212> PRT

<213> pig

<220>

<221> MOD_RES

<222> (153)

<223> AMIDATION

<400> 2

```
Met Arg Ala Ala Thr Pro Leu Gln Thr Val Asp Arg Pro Lys Asp Trp
  1           5           10           15

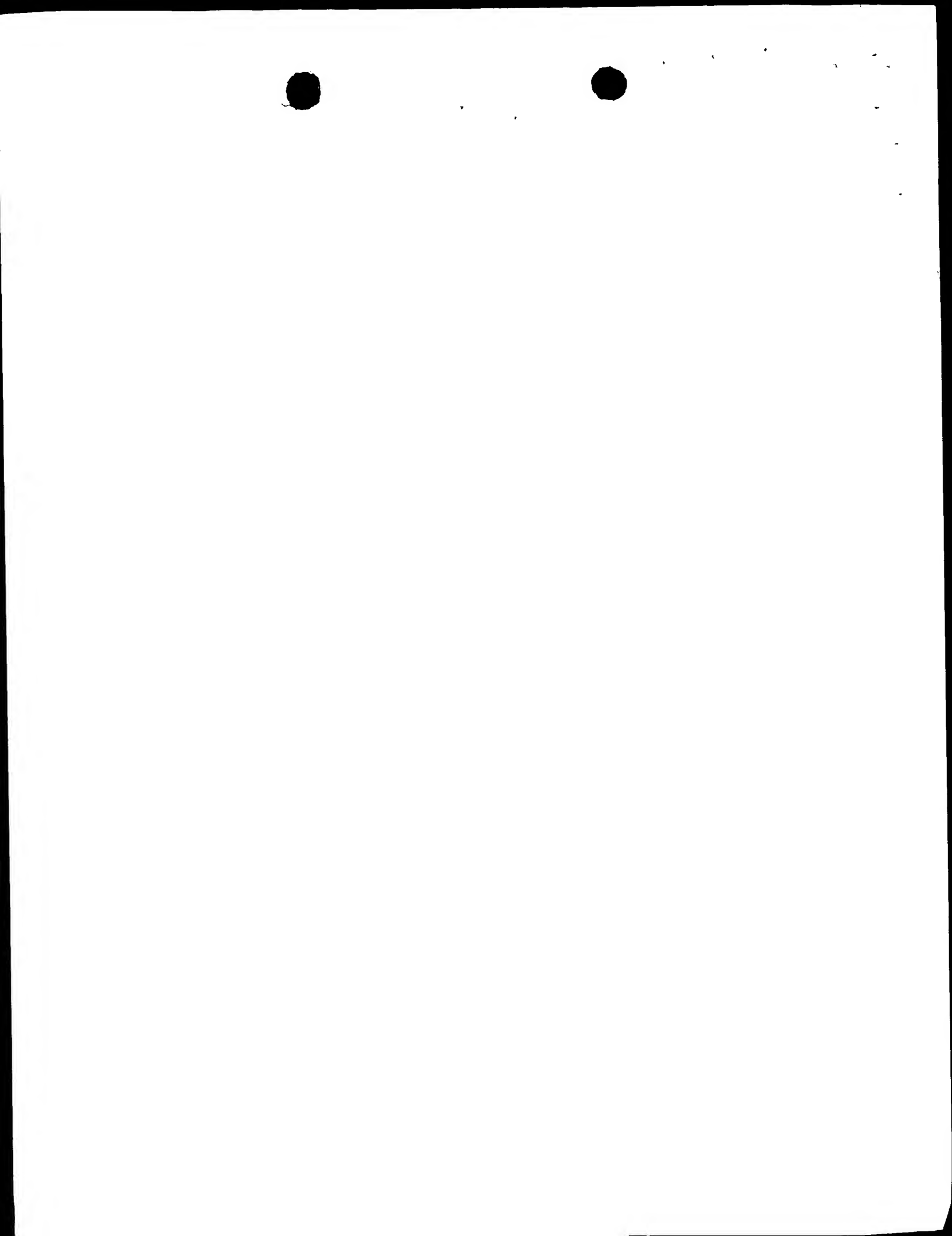
Tyr Lys Thr Met Phe Lys Gln Ile His Met Val His Lys Pro Asp Asp
      20           25           30

Asp Thr Asp Met Tyr Asn Thr Pro Tyr Thr Tyr Asn Ala Gly Leu Tyr
      35           40           45

Asn Ser Pro Tyr Ser Ala Gln Ser His Pro Ala Ala Lys Thr Gln Thr
      50           55           60

Tyr Arg Pro Leu Ser Lys Ser His Ser Asp Asn Gly Thr Asp Ala Phe
      65           70           75           80

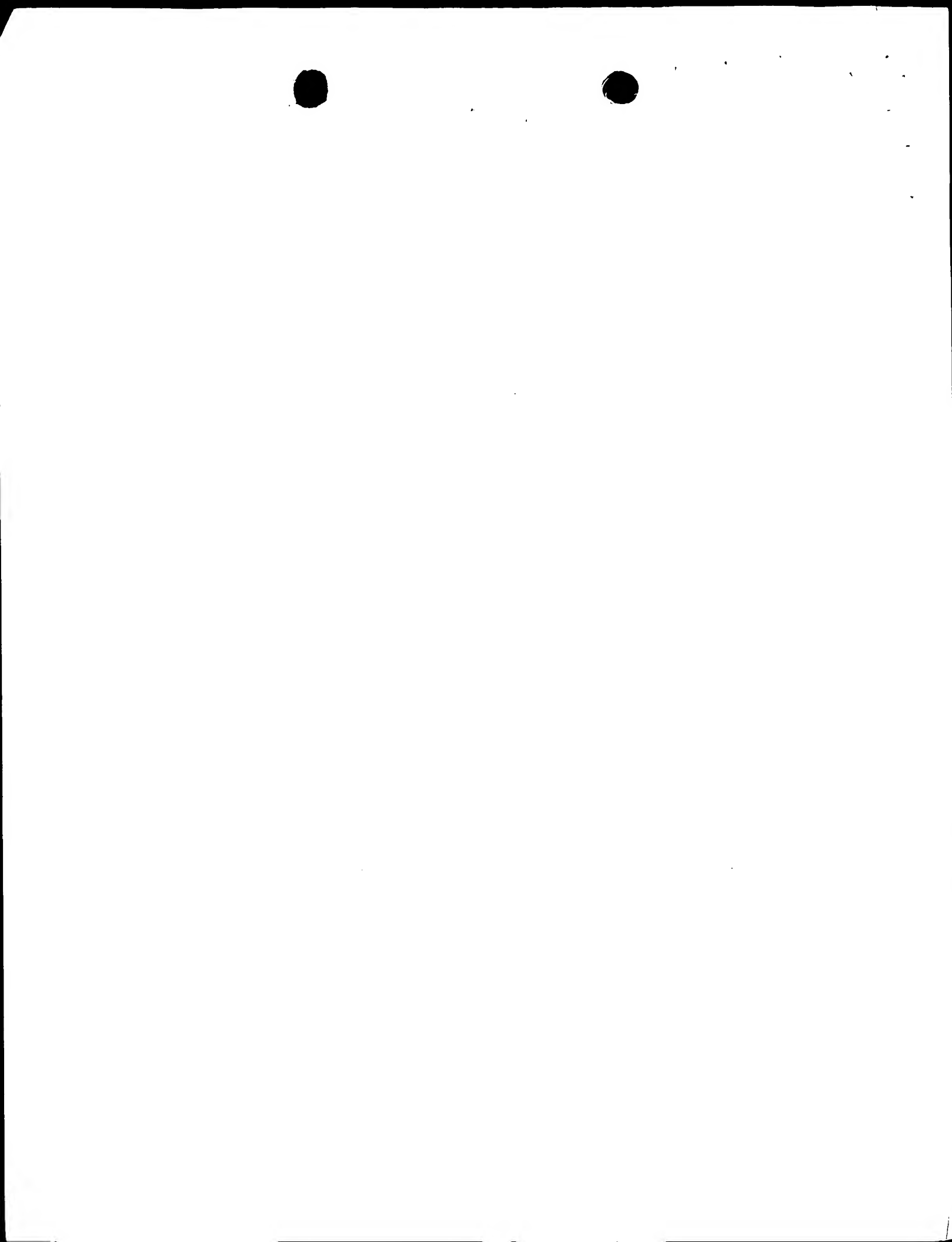
Lys Asp Ala Ser Ser Pro Val Pro Pro Pro His Val Pro Pro Pro Val
```




```

<400> 4
Met Lys Ala Thr Thr Pro Leu Gln Thr Val Asp Arg Pro Lys Asp Trp
  1                               5                               10                               15
Tyr Lys Thr Met Phe Lys Gln Ile His Met Val His Lys Pro Asp Asp
                20                               25                               30
Asp Thr Asp Met Tyr Asn Thr Pro Thr Pro His Met Lys Tyr Thr Tyr
        35                               40                               45
Asn Ala Gly Leu Tyr Asn Pro Pro Tyr Ser Ala Gln Ser His Pro Ala
    50                               55                               60
Ala Lys Thr Gln Thr Tyr Arg Pro Leu Ser Lys Ser His Ser Asp Asn
    65                               70                               75                               80
Ser Pro Asn Ala Phe Lys Asp Ala Ser Ser Pro Val Pro Pro Pro His

```



85

90

95

Val Pro Pro Pro Val Pro Pro Leu Arg Pro Arg Asp Arg Ser Ser Thr
100 105 110

Glu Lys His Asp Trp Asp Pro Pro Asp Arg Lys Val Asp Thr Arg Asn
115 120 125

Phe Gly Ser Glu Pro Arg Ser Ile Phe Glu Tyr Glu Pro Gly Lys Ser
130 135 140

Ser Ile Leu Gln His Glu Arg Pro Val Thr Lys Pro Gln Ala
145 150 155

<210> 5

<211> 1794

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

atgaaagcaa caacaccttt gcagacagtc gaccggccca aggactggta caagacgatg 60
tttaagcaaa ttcacatggt gcacaagccg gatgatgaca cagacatgta taatactcct 120
acacctcaca tgaaatatac atacaatgca ggtctgtaca acccacccta cagtgtctcag 180
tcacaccctg ctgcaaaagac ccaaacctac agacctcttt ccaaaagcca ctccgacaac 240
agccccaatg cctttaagga tgcgtctctc ccagtgcctc cccacatgt tccacctcca 300
gtcccgcgcg ttcgaccaag agatcggctc tcaacagaaa agcatgactg ggatcctcca 360
gacagaaaag tggacacaag aaatttcggg tctgagccaa ggagtatttt tgaatacgag 420
cctgggaagt catccatcct gcagcacgaa cgacctctc accagtcttc catagacaga 480
agcttgaaaa gaccacagcag ctctgcaagc atggcgggtg acttttagaaa acggagggaag 540
agtgaacctg cagtgggccc gccaggggac ttggggggtc acagttcaag caggaccagc 600
cccggccggg cagacctccc aggatcaagt tccaccttta ccacgtcttt cattagttct 660
tctccttctc ctccctcgag agcacaaggt ggggatgata gcaaaatgtg tccgccccct 720
tgcagttact cggggtctca tggctcgccc tctagtgaat tagagtgtct cggcgcttat 780
agaaggcact tggacgtccc ccaggactct caaagggcca tcactttcaa gaacggctgg 840
caaatggccc ggcaaaatgc agagatctgg agtagcactg aagaggcggg tccccccaaa 900
atcaaatcac gaagctgtga cgatctcctg aatgatgact gcggcagctt ccagacct 960
aaaaccaagt cagaaagcat gggttctctg ttatgtgacg aaggctccaa agagagcgac 1020
cccatgacgt ggacttcccc ctacatcccg gaagtgtgag ggaacagcag agaattcatg 1080
tttaagcaaa tggatattcg tggaaatctc ggatggagga ccattttgga aagtgtctaaa 1140
ggaatatcta taatgagtga ggaatctatg agaaagatgt aaagtgtgaa acgtaaaatt 1200
tttggtttag tagatgatca ctgatttaaa tgtataacag agtagatgcc cccccctca 1260
aaaacgcata accccccctt taccctgaca tttagctttg aatatgcaca aaatagtttg 1320
tgggtagaat agaaccctat gtctgaaagt atatgtgttg ggatttcatc ccatatatgg 1380
tggtagccgc caactcagag ataggtcgtt ctgttagatt ctcaacaaca aaatgtataa 1440
cacaagcttg aattcatggt taagcaataa aaaataatgt gggagactgg acagaggtca 1500
gggacccag ggtgccaagt gtagctcaga gtcaccattg gtgaatcgct tcatctccat 1560
gtggaaactaa atgcaactaa gtgatttctt aggttttccc cagtcattct tagtgaaaat 1620
atggacttcc cacatcaatt ctgagtcact ttcttccac ctggaatgat taccattttt 1680
ctcatagtca gtgtatgcag cagcatatac cctcatttgc ctttgggtac attcctgagt 1740
caaatgtat aacacaaggt cacgaaaccg caagcagggc gccgtgataa gtcc 1794

```

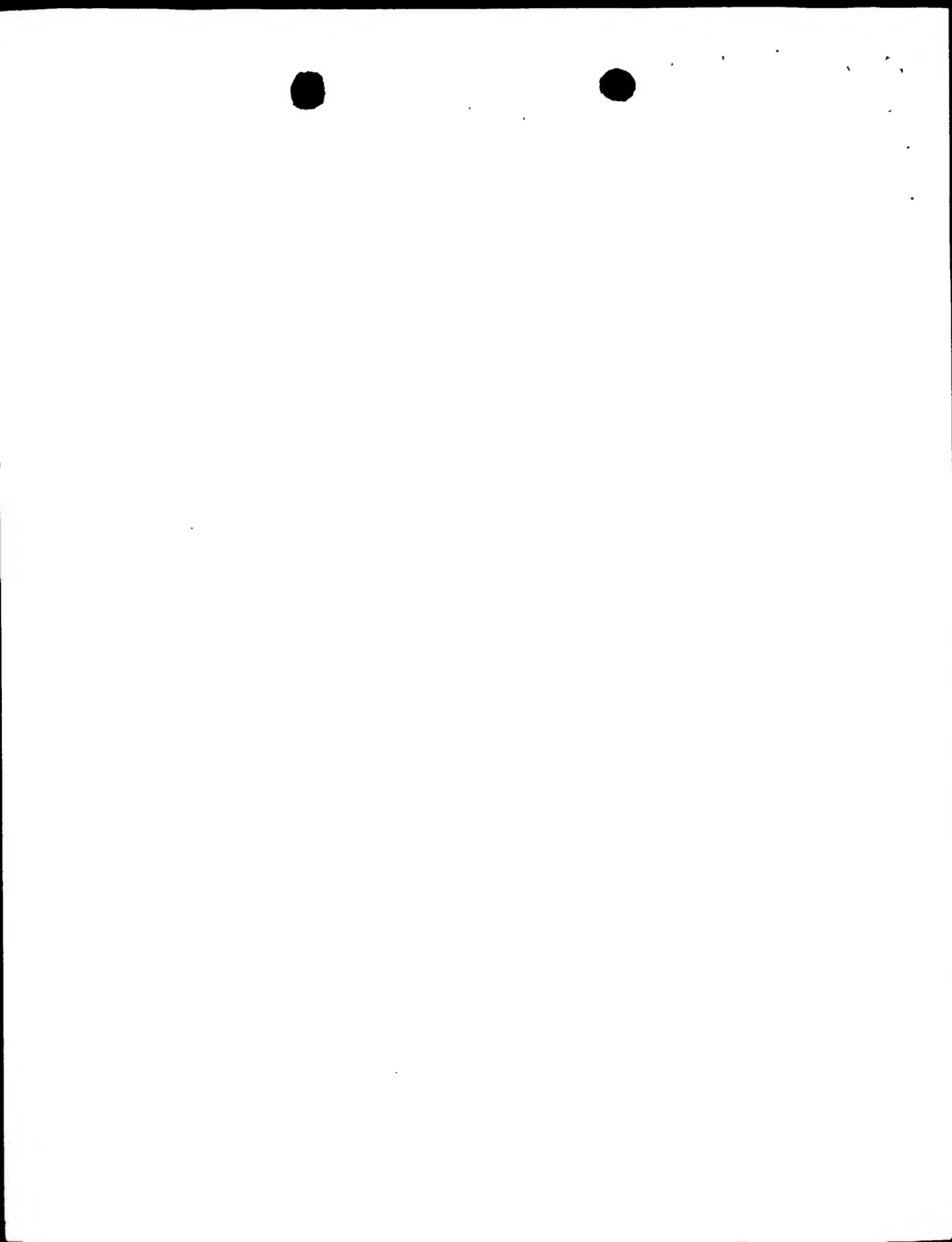
<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 6



cccgtcacga aaccgcaagc a

21

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 cacgaacgac ccgtcacgaa accgcaagca

30

<210> 8
 <211> 120
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 8
 cctccagaca gaaaagtggg cacaagaaat ttcgggtctg agccaaggag tatttttgaa 60
 tacgagcctg ggaagtcac catcctgcag cacgaacgac ccgtcacgaa accgcaagca 120

<210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)
 <223> AMIDATION

<400> 9
 Pro Val Thr Lys Pro Gln Ala
 1 5

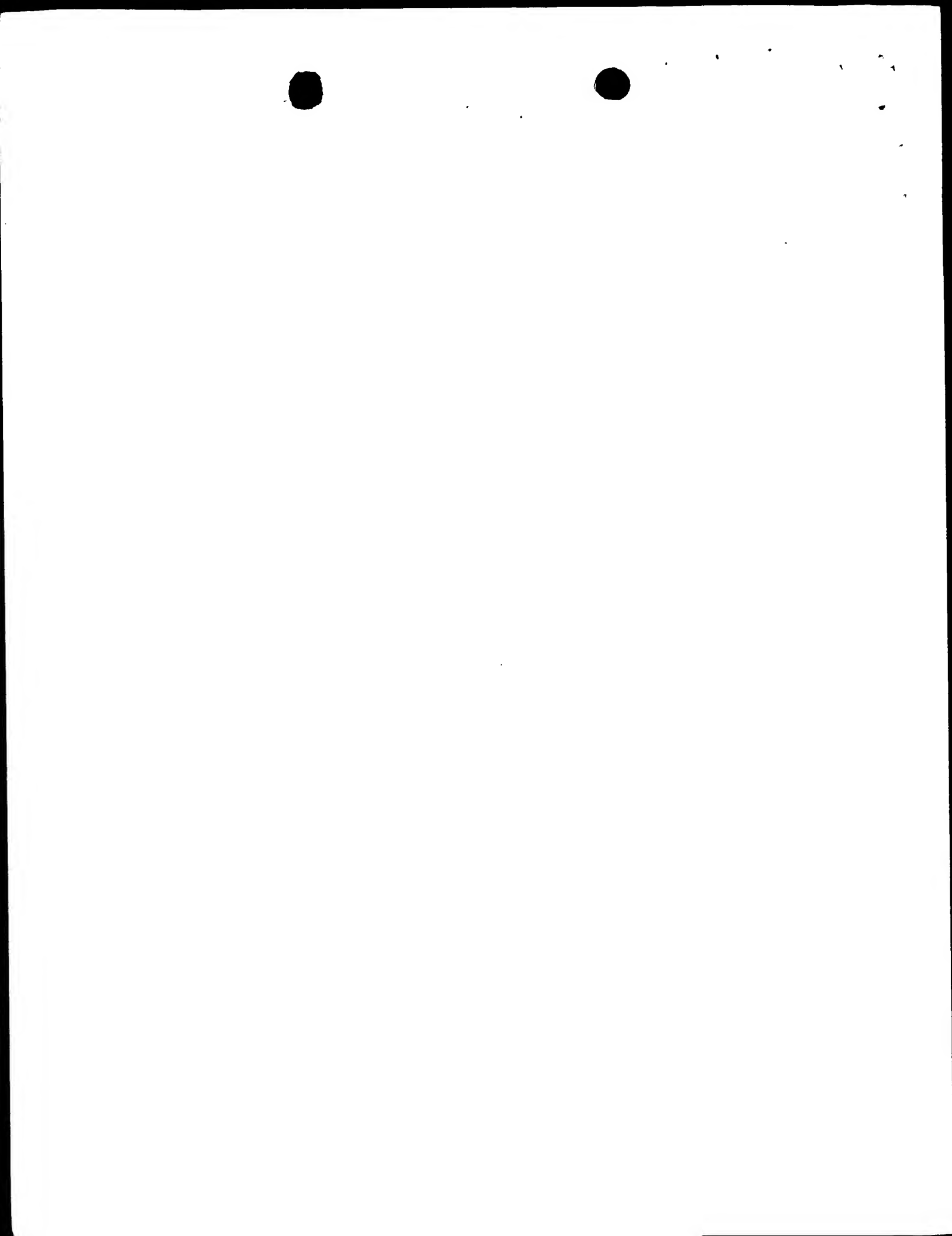
<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)
 <223> AMIDATION

<400> 10
 His Glu Arg Pro Val Thr Lys Pro Gln Ala
 1 5 10

<210> 11
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>



<221> MOD_RES
 <222> (40)
 <223> AMIDATION

<400> 11

Pro Pro Asp Arg Lys Val Asp Thr Arg Asn Phe Gly Ser Glu Pro Arg
 1 5 10 15
 Ser Ile Phe Glu Tyr Glu Pro Gly Lys Ser Ser Ile Leu Gln His Glu
 20 25 30
 Arg Pro Val Thr Lys Pro Gln Ala
 35 40

<210> 12
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Artificial sequence description: primers
 used for the RT-PCRs

<400> 12
 aargayacnt ayaarac

17

<210> 13
 <211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Artificial sequence description: primers
 used for the RT-PCRs

<400> 13
 cggccgaagg actggta

17

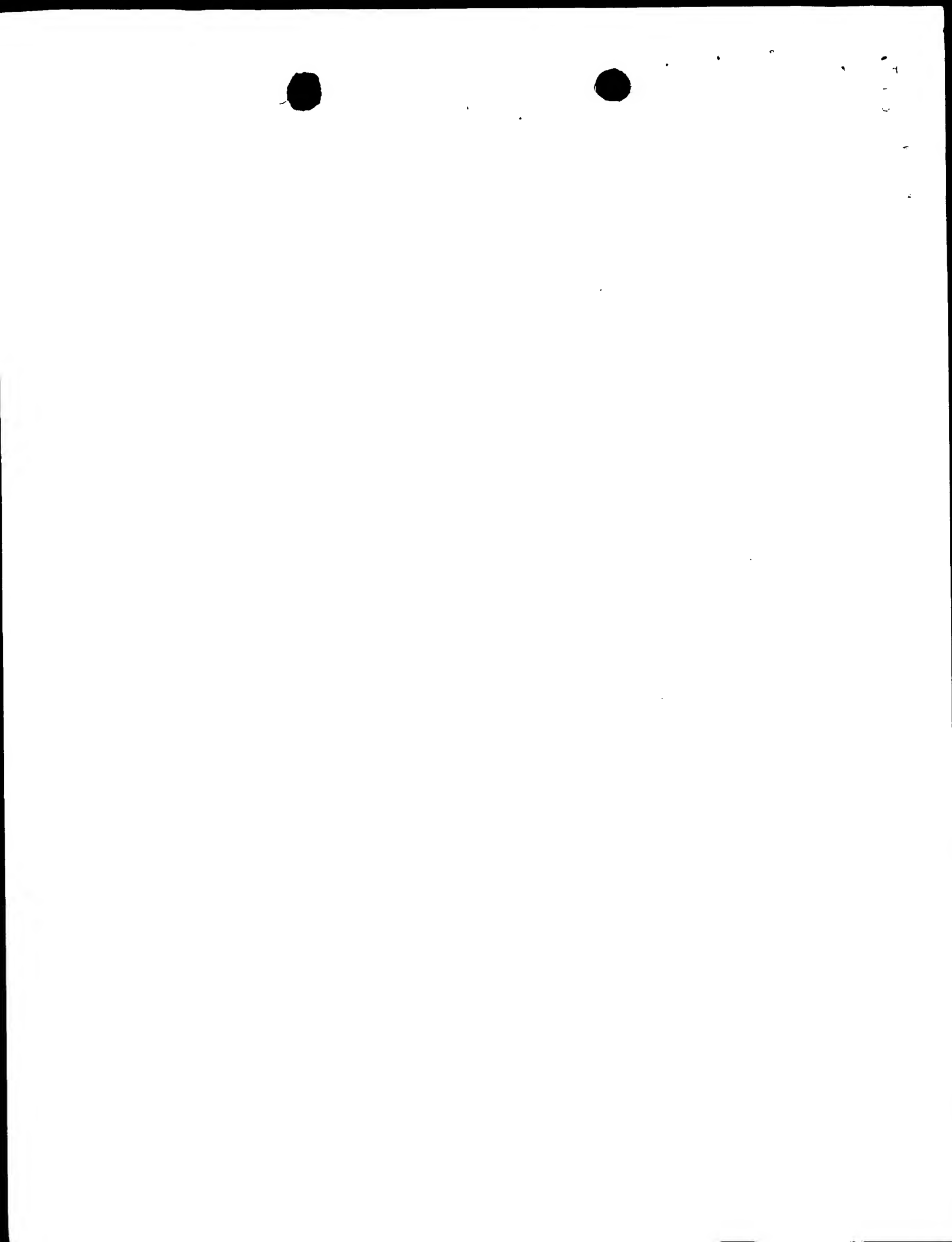
<210> 14
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

<220>
 <223> Artificial sequence description: primers
 used for the RT-PCRs

<400> 14
 acaagccgag atgatgac

18

<210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence



<220>

<223> Artificial sequence description: primers
used for the RT-PCRs

<400> 15

gttttcaaca gaaaagcatg ac

22

<210> 16

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence description: primers
used for the RT-PCRs

<400> 16

ggncgytcrt gytgyag

17

<210> 17

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence description: primers
used for the RT-PCRs

<400> 17

ggatcccagt catgctt

17

<210> 18

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence description: primers
used for the RT-PCRs

<400> 18

tggatgactt cccaggc

17

<210> 19

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Artificial sequence description: primers
used for the RT-PCRs

<400> 19

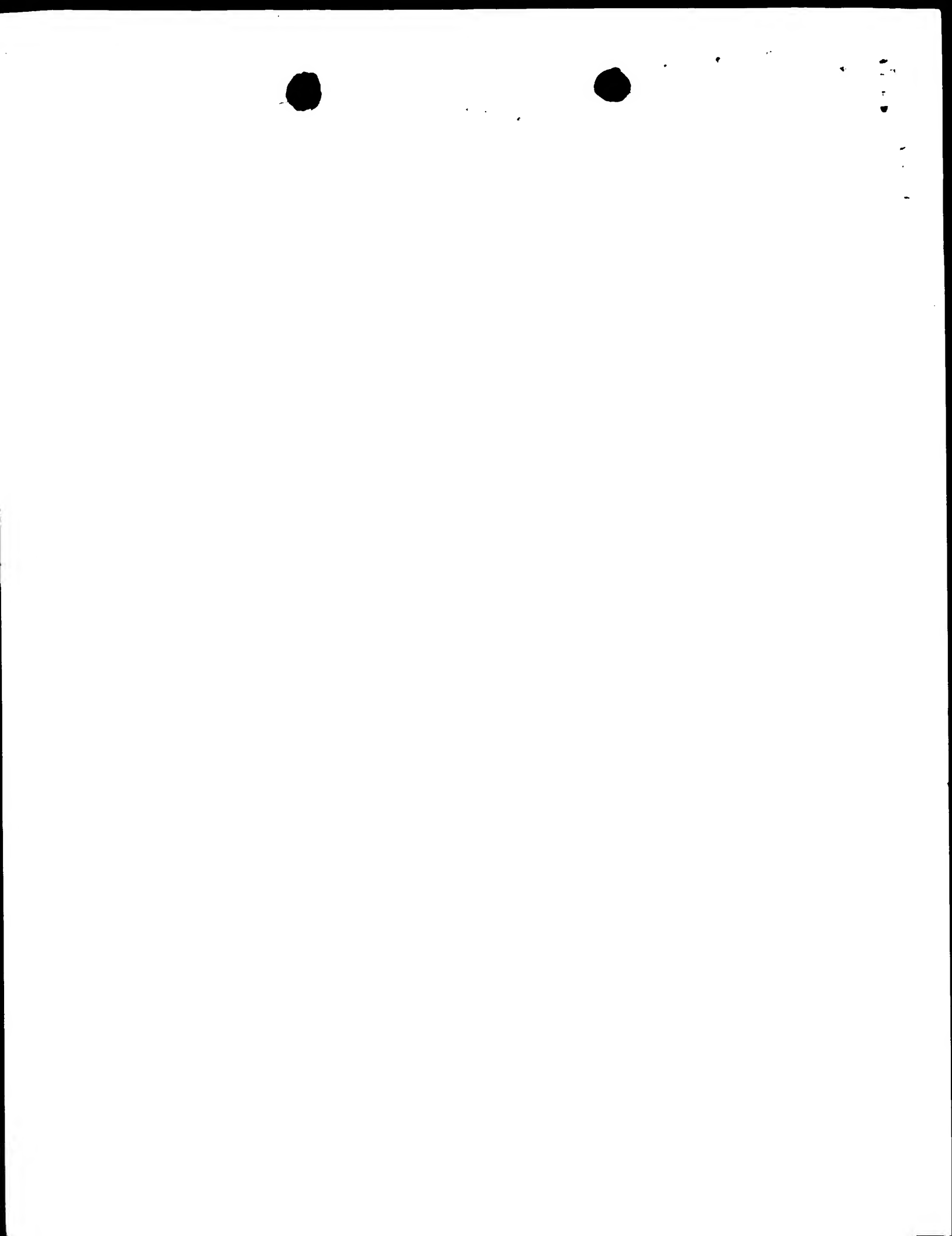
gggtcgttcg tgctgcagga tggatgactt cccaggctcg tattcaaa

48

<210> 20
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial sequence

<220>
<223> Artificial sequence description: primers
used for the RT-PCRs

<400> 20
tgcttgcggt ttcgtgacgg g



**ACIDES NUCLEIQUES CODANT POUR DES PEPTIDES POSSEDANT L'ACTIVITE
BIOLOGIQUE DE LA SORBINE.**

La présente invention concerne les acides nucléiques codant
5 pour des peptides possédant l'activité biologique de la sorbine, les peptides
ainsi codés et leurs applications thérapeutiques.

La sorbine est connue comme étant un peptide de 153 acides
aminés et de 17500 Da, isolé et purifié à partir de l'intestin grêle de porc
10 (Vagne-Descroix et al, Eur. J. Biochem, 1991, 201: 53-59, et demande de
brevet WO89/06241). Une des activités biologiques connues de cette molécule
consiste en une augmentation de l'absorption d'eau et d'électrolytes (comme
les ions chlorures et sodium) au niveau de l'intestin et de la vésicule biliaire
(Charpin et al, Gastroenterology, 1992, 103: 1568-1573). Par ses propriétés
15 sur l'absorption, la sorbine peut être utilisée de manière avantageuse en
thérapeutique, notamment dans le traitement des diarrhées, des
malabsorptions chroniques ou de certains troubles électrolytiques.

Afin de produire à grande échelle de la sorbine active, le clonage
de la séquence nucléotidique codant pour ce peptide était indispensable. Or,
20 jusqu'à présent, ce clonage n'avait pu aboutir, en raison de difficultés
particulières liées à la structure du peptide et à sa faible expression.

En effet, le site actif de la sorbine est situé dans la partie C-
terminale de la séquence, qui est une région insensible à l'action de la trypsine
et de la chymotrypsine et à l'oxydation. La séquence protéique de la sorbine
25 telle que déterminée par séquençage automatique après purification, contient
de nombreux acides aminés codés par des codons dégénérés avec seulement
4 méthionines. Le clonage d'une séquence codante à partir de la séquence
d'acides aminés correspondante connue nécessite le choix d'amorces
oligonucléotidiques pour la technique de réaction en chaîne par la polymérase
30 (PCR). Le degré de dégénérescence des amorces étant exceptionnellement
élevé dans le cas du clonage de la sorbine, le nombre théorique de séquences
susceptibles d'être obtenues à partir de ces amorces était de l'ordre de 6.10^{24} .

En outre les auteurs de la présente invention ont dû faire face au problème de la faible expression de la sorbine dans les tissus normaux, due au très petit nombre de cellules endocrines et à la rareté des ARNm.

5 Les auteurs de l'invention sont à présent parvenus à cloner le gène de la sorbine, notamment chez le porc et l'homme.

La présente invention a donc pour objet un acide nucléique codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, ledit acide nucléique comprenant la séquence nucléotidique choisie parmi :

- 10 a) la séquence SEQ ID n° 1 ;
b) la séquence SEQ ID n° 3 ;
c) une séquence nucléotidique homologue de la séquence SEQ ID n° 1 ou n° 3 ; et
d) au moins un fragment nucléotidique desdites séquences a), b)
15 ou c).

La séquence SEQ ID n°1 représente la séquence d'ADNc codant pour la sorbine porcine.

20 La séquence SEQ ID n°3 représente la séquence d'ADNc codant pour la sorbine humaine, obtenue à partir d'ARN de gros intestin normal par RT-PCR.

La présente invention a également pour objet un acide nucléique comprenant la séquence SEQ ID n° 5. Cette séquence représente une séquence d'ADNc obtenue à partir d'ARN d'une tumeur intestinale par RT-PCR. Elle est cependant également présente dans le tissu humain normal. On parlera préférentiellement de forme courte pour la séquence d'ADNc SEQ ID n° 3 et de forme longue pour la séquence d'ADNc SEQ ID n° 5. Un long fragment inconnu est inséré dans la forme longue en amont du site d'amidation et des six derniers acides aminés de la région C-terminale. Les homologues et les fragments de cette forme longue sont également compris dans la présente invention.

30 Par "séquence nucléotidique homologue", on entend toute séquence nucléotidique qui diffère de la séquence SEQ ID n°1, SEQ ID n° 3

ou SEQ ID n° 5 par substitution, délétion, et/ou insertion d'un nucléotide ou d'un nombre réduit de nucléotides, à des positions telles que ces séquences nucléotidiques homologues codent pour des polypeptides homologues tels que définis ci-après.

5 De préférence, une telle séquence nucléotidique homologue est identique à au moins 75 % des séquences SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 5, de préférence au moins 85 %, de préférence encore au moins 95 %.

De manière préférentielle, une telle séquence nucléotidique homologue hybride spécifiquement aux séquences complémentaires des
10 séquences SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 5, dans des conditions stringentes. Les paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle 50% des brins appariés se séparent (T_m).

Pour les séquences comprenant plus de 30 bases, T_m est définie par la relation : $T_m = 81,5 + 0,41(\%G+C) + 16,6 \log(\text{concentration en cations}) - 0,63(\% \text{formamide}) - (600/\text{nombre de bases})$ (Sambrook et al, Molecular
15 Cloning, A laboratory manual, Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989, pages 9.54-9.62).

Pour les séquences de longueur inférieure à 30 bases, T_m est définie par la relation : $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$.

20 Dans des conditions de stringence appropriées, auxquelles les séquences aspécifiques n'hybrident pas, la température d'hybridation est approximativement de 5 à 30°C, de préférence de 5 à 10°C en dessous de T_m , et les tampons d'hybridation utilisés sont de préférence des solutions de force ionique élevée telle qu'une solution 6xSSC par exemple.

25 Par « fragment nucléotidique », on entend tout fragment des séquences SEQ ID n° 1, SEQ ID n° 3 ou SEQ ID n° 5 ou des séquences nucléotidiques homologues de ces dernières, qui code pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine.

Par "activité biologique de la sorbine", on se réfère notamment à
30 l'activité connue et mesurable de la sorbine sur l'absorption de l'eau et des électrolytes. L'activité de la sorbine peut être notamment mesurée par la diminution de poids d'une vésicule biliaire isolée, remplie de solution de Krebs (Data for Biochemical Research, Dawson RWC, Elliott D, Elliott WH, Jones KM.,

Oxford at Clarendon Press, (1959)) et plongée dans cette solution nutritive de Krebs, la diminution du poids traduisant une absorption du contenu hydrique de la vésicule biliaire. Cette diminution de poids est accentuée pour les vésicules traitées par rapport aux témoins.

5 L'activité de la sorbine peut être mesurée également par la disparition des électrolytes, notamment des ions Na^+ et Cl^- à partir d'une anse intestinale ligaturée *in situ* chez un rat anesthésié, remplie avec une solution de concentration connue. La disparition des ions après un temps donné traduit l'absorption de ces ions de la lumière intestinale vers le milieu intérieur.

10 Une activité antisécrétoire de la sorbine peut être également mesurée avec le modèle ci-dessous au cours de la stimulation de la sécrétion intestinale par le peptide vasoactif intestinal ou par la toxine cholérique. La sorbine provoque en effet une diminution des sécrétions d'eau, des ions Na^+ et Cl^- dans ce modèle (Marquet et al, 1994 ; Grishina et al, 1995 ; Marquet et al,
15 1998).

L'activité biologique de la sorbine étant portée par la forme amidée, les fragments nucléotidiques d'intérêt sont donc avantageusement les fragments comprenant les codons correspondant au site d'amidation Gly-Arg-Arg.

20 Parmi les fragments d'intérêt, on peut citer notamment les fragments nucléotidiques comprenant les séquences SEQ ID n° 6 à 8, codant pour les peptides amidés de séquences d'acides aminés SEQ ID n° 9 à 11 respectivement.

25 Les différentes séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences d'ADN ou d'ARN, obtenues par criblage de banques de séquences au moyen de sondes élaborées sur la base de la séquence SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 5. De telles banques peuvent être préparées par des techniques classiques de biologie moléculaire, connues de l'homme de l'art.

30 Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage des banques.

Les séquences nucléotidiques de l'invention permettent la réalisation de sondes nucléotidiques, hybridant spécifiquement avec une séquence SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 5 selon l'invention. Les conditions d'hybridation appropriées correspondent aux conditions de température et de force ionique usuellement utilisées par l'homme du métier, de préférence dans des conditions stringentes telles que définies précédemment. De telles sondes font également partie de l'invention. Elles peuvent être utilisées comme outil de diagnostic *in vitro* pour la détection, par des expériences d'hybridation, notamment d'hybridation "*in situ*", de transcrits spécifiques des polypeptides de l'invention dans des échantillons biologiques ou pour la mise en évidence de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques résultant d'un polymorphisme, de mutations ou d'un mauvais épissage.

Les sondes de l'invention comportent au minimum 10 nucléotides, et de préférence au moins 14 nucléotides, préférentiellement au moins 20 nucléotides, préférentiellement encore au moins 50 nucléotides, et au maximum comportent la totalité de la séquence nucléotidique SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 5 ou de leur brins complémentaires.

Préférentiellement, les sondes de l'invention sont marquées, préalablement à leur utilisation. Pour cela, plusieurs techniques sont à la portée de l'homme du métier comme par exemple le marquage fluorescent, radioactif, chimioluminescent ou enzymatique.

Les méthodes de diagnostic *in vitro* dans lesquelles ces sondes nucléotidiques sont mises en oeuvre pour la détection de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques, telles que la perte d'hétérozygotie et le réarrangement génique, au niveau des séquences nucléiques codant pour un peptide de l'invention, sont incluses dans la présente invention.

L'invention a aussi pour objet un procédé de détection de l'expression de la sorbine dans un échantillon cellulaire ou tissulaire, comprenant les étapes consistant à :

- préparer l'ARN dudit échantillon ;
- mettre en contact ledit ARN obtenu avec une sonde ayant une séquence nucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement avec un acide

nucléique codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, tel que défini précédemment ;

- détecter la présence d'ARNm hybridant avec cette sonde, indicatrice de l'expression d'un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine dans l'échantillon.

L'invention a aussi pour objet un procédé de détection de l'expression de la sorbine dans des cellules ou un tissu par hybridation *in situ*, comprenant les étapes consistant à:

- mettre en contact lesdites cellules ou ledit tissu avec une sonde ayant une séquence nucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement avec un acide nucléique codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, tel que défini précédemment ;

- détecter la présence d'ARNm hybridant avec cette sonde, indicatrice de l'expression du peptide possédant l'activité biologique de la sorbine.

Les sondes d'ADNc de l'invention sont en outre avantageusement utilisables pour la détection d'anomalies chromosomiques.

Les séquences nucléotidiques de l'invention sont également utiles pour la fabrication et l'utilisation d'amorces oligonucléotidiques sens et/ou antisens pour des réactions de séquençage ou d'amplification spécifique selon la technique dite de PCR (réaction en chaîne par la polymérase) ou toute autre variante de celle-ci.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention ont par ailleurs des utilisations dans le domaine thérapeutique, pour la réalisation de séquences antisens, capables de s'hybrider spécifiquement avec une séquence d'acide nucléique, y compris un ARN messager, utilisables en thérapie génique. L'invention a ainsi pour objet des séquences antisens capables d'inhiber, au moins partiellement, la production de sorbine, telle que définie précédemment. De telles séquences sont avantageusement constituées par celles qui constituent le cadre de lecture codant pour la sorbine au niveau du transcrit.

Parmi les amorces ou sondes oligonucléotidiques d'intérêt, on peut notamment citer les oligonucléotides comprenant les séquences SEQ ID n° 12 à SEQ ID n° 20 ou leurs séquences complémentaires.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent en outre
5 être utilisées pour transformer des cellules cibles et leur faire exprimer un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine.

L'invention a donc également pour objet une composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique selon l'invention codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, en association avec un
10 véhicule pharmaceutiquement acceptable, ladite composition étant destinée à être utilisée en thérapie génique. L'acide nucléique d'intérêt, de préférence inséré dans un vecteur, peut être administré sous forme nue ou en association avec au moins un agent facilitant la transfection dudit acide nucléique.

A partir des séquences d'ADNc clonées, les auteurs de la
15 présente invention ont pu en déduire la séquence d'acides aminés des peptides codés par ces séquences d'ADNc.

La séquence SEQ ID n°2 est la séquence d'acides aminés de la sorbine porcine.

La séquence SEQ ID n°4 est la séquence d'acides aminés de la
20 sorbine humaine de forme courte, codée par la séquence nucléotidique SEQ ID n° 3 obtenue à partir d'ARN de gros intestin normal par RT-PCR.

Les auteurs de la présente invention ont comparé la séquence protéique de la sorbine porcine traduite à partir de l'ADNc (SEQ ID n°2) avec la séquence de la sorbine obtenue par séquençage protéique (WO 89/06241).
25 Il s'est avérée que la séquence de la sorbine disponible jusqu'à présente, obtenue par séquençage protéique (automatique ou manuel), contenait des erreurs. Les corrections sont les suivantes : remplacement W16T et remplacements D35K et W112R.

La présente invention a donc pour objet un peptide recombinant
30 possédant l'activité biologique de la sorbine et comprenant la séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID n° 2, SEQ ID n° 4 et SEQ ID n° 11.

Sont également compris dans l'invention les peptides homologues des peptides de séquence SEQ ID n°2 ou n°4.

Par « peptide homologue », on entend tout peptide ayant une séquence d'acides aminés qui diffère des séquences SEQ ID n°2 ou n°4 par substitution, délétion et/ou insertion d'un acide aminé ou d'un nombre réduit d'acides aminés, à des positions telles que ces modifications ne portent pas significativement atteinte à l'activité biologique de la sorbine. Est exclu de cette définition des peptides homologues, le peptide ayant la séquence obtenue par séquençage automatique tel que représenté figure 1.

Lesdites substitutions sont de préférence des substitutions conservatives, c'est-à-dire des substitutions d'acides aminés de même classe, tels que des substitutions d'acides aminés aux chaînes latérales non chargées (tels que l'asparagine, la glutamine, la serine, la thréonine, et la tyrosine), d'acides aminés aux chaînes latérales basiques (tels que la lysine, l'arginine, et l'histidine), d'acides aminés aux chaînes latérales acides (tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique) ; d'acides aminés aux chaînes latérales apolaires (tels que la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane, et la cystéine).

De préférence, une telle séquence d'acides aminés homologue est identique à au moins 85 %, de préférence au moins 95 % des séquences SEQ ID n° 2 ou n°4.

L'homologie est généralement déterminée en utilisant un logiciel d'analyse de séquence (par exemple, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Des séquences d'acides aminés similaires sont alignées pour obtenir le maximum de degré d'homologie (i.e. identité). A cette fin, il peut être nécessaire d'introduire de manière artificielle des espaces (« gaps ») dans la séquence. Une fois l'alignement optimal réalisé, le degré d'homologie (i.e. identité) est établi par enregistrement de toutes les positions pour lesquelles les acides aminés des deux séquences comparées sont identiques, par rapport au nombre total de positions.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent par ailleurs être utilisées pour la production de polypeptides recombinants possédant l'activité biologique de la sorbine tels que précédemment définis.

Ces polypeptides peuvent être produits à partir des séquences
5 nucléotidiques définies ci-dessus, selon des techniques de production de produits recombinants connues de l'homme du métier.

Selon un mode de réalisation de l'invention, la séquence
nucléotidique peut être insérée dans un vecteur d'expression, dans lequel elle
10 est liée de manière opérante à des éléments permettant la régulation de son expression, tels que notamment des promoteurs et/ou terminateurs de transcription.

Les signaux contrôlant l'expression des séquences
15 nucléotidiques (promoteurs, activateurs, séquences de terminaison...) sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. À cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment
20 utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple l'électroporation ou la précipitation au phosphate de calcium.

Les vecteurs de clonage et/ou d'expression tels que décrits ci-dessus, contenant une des séquences nucléotidiques définies selon l'invention
25 font également partie de la présente invention. On peut utiliser notamment le vecteur Blue Script SKII (Stratagene) et le vecteur λ gt 11 (Stratagene).

L'invention vise en outre les cellules hôtes transfectées, de manière transitoire ou stable, par ces vecteurs d'expression. Ces cellules
30 peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes, procaryotes ou eucaryotes, d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions

permettant la réplication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

Les cellules hôtes selon l'invention sont utilisables dans un procédé de production de peptide recombinant possédant l'activité biologique de la sorbine, ledit procédé comprenant les étapes consistant à :

i) insérer une séquence nucléotidique telle que définie précédemment dans un vecteur d'expression, ladite séquence nucléotidique étant liée de manière opérante avec des éléments permettant la régulation de son expression ;

ii) transformer une cellule hôte avec le vecteur ainsi obtenu ;

iii) cultiver ladite cellule hôte dans des conditions permettant l'expression de ladite séquence nucléotidique ;

iv) recueillir le peptide recombinant exprimé ;

v) éventuellement purifier ledit peptide ;

vi) éventuellement procéder à une amidation du peptide produit (dans le cas où la cellule hôte est une cellule procaryote).

L'étude des propriétés biologiques de la sorbine a mis en évidence son effet avantageux sur l'absorption de l'eau, des électrolytes et des nutriments par les muqueuses, en particulier les muqueuses digestives.

Les auteurs de l'invention ont montré que la séquence active de ce peptide est spécifique de certains tissus, le duodénum, le jéjunum chez le porc, s'étendant à l'iléon et au côlon chez l'homme ainsi qu'à certaines régions du système nerveux central et périphérique.

La présence de la sorbine dans des tissus divers attribue à ce peptide et à ses fragments, un rôle dans le transport cellulaire des électrolytes, et en particulier du chlore à tous les niveaux et en particulier du tractus digestif et du système nerveux central. Au niveau du système nerveux central, il intervient dans les troubles du comportement liés en particulier à un déséquilibre ionique.

Ces propriétés avantageuses s'accompagnent d'une grande innocuité.

L'invention vise donc des compositions pharmaceutiques comprenant une quantité efficace d'au moins un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine tel que défini précédemment, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

5 Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être notamment administrée par voie orale, parentérale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, percutanée ou par administration intra-nasale.

La préparation des compositions pharmaceutiques qui contiennent des principes actifs dissous ou dispersés dans ces dernières, est
10 bien connue de l'homme du métier. Généralement, ces compositions sont préparées sous la forme de solutions ou de suspensions injectables. Cependant, elles peuvent aussi être sous des formes solides appropriées pour préparer des solutions, ou des suspensions extemporanément. Les préparations peuvent aussi être émulsifiées.

15 Les modes d'administration, les posologies et les formes galéniques des compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être déterminés de manière usuelle par l'homme du métier, notamment selon les critères généralement pris en compte pour l'établissement d'un traitement thérapeutique adapté à un patient, comme par exemple l'âge ou le poids
20 corporel du patient, la gravité de son état général, la tolérance au traitement, et les effets secondaires constatés, etc.

Les compositions pharmaceutiques de l'invention comprenant un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, ainsi que les compositions
25 pharmaceutiques comprenant un acide nucléique codant pour un tel peptide, sont particulièrement utiles dans :

- le traitement des diarrhées infectieuses et des toxicoses aiguës du nourrisson par l'effet bénéfique d'une augmentation de l'absorption de l'eau et des électrolytes,

- 30 - le traitement adjuvant de la réanimation parentérale lors de la réinduction de l'alimentation entérale, au cours de maladies infectieuses, d'interventions chirurgicales, en particulier sur la sphère digestive,

- le traitement de certaines malabsorptions chroniques par augmentation de l'absorption des glucides et des aminoacides liée à l'augmentation de l'absorption de l'eau et des électrolyses,

5 - le traitement de certains troubles électrolytiques et notamment ceux de la mucoviscidose, caractérisés par un trouble de la réabsorption des électrolytes au niveau des glandes sudoripares, salivaires, bronchiques, de l'intestin et du pancréas,

10 - le traitement des obésités et des surcharges hydriques par les dérivés substitués des polypeptides et peptides de l'invention qui suppriment l'absorption de l'eau, des électrolytes et des nutriments.

La présence de sorbine dans les fibres nerveuses pourrait permettre de qualifier la sorbine de peptide neurocrine. La co-localisation de la sorbine avec des hormones et des neurotransmetteurs comme la sérotonine corrobore l'hypothèse d'un facteur peptidique neurocrine.

15 La séquence totale de la sorbine est de 153 acides aminés (459 nucléotides), représentant une faible partie du transcrit codant estimé entre 6,5 et 8 Kb, en Northern Blot. Cette différence de taille permet de supposer que la sorbine fait partie d'un complexe protéique de type pré-pro-protéines. Un tel complexe existe dans la majorité des systèmes endocriniens, et en
20 particulier pour le « Vasoactive Intestinal Peptide », VIP.

On pourrait aussi lui attribuer un effet intracrine. En effet, la séquence interne non impliquée dans l'effet physiologique principal de la sorbine est riche en prolines et arginines. La présence des régions fortement riches en ces deux acides aminés est connue actuellement par son implication
25 dans la fixation sur les domaines SH3 des tyrosines kinases. Dans ce cas la séquence interne de la sorbine pourrait servir d'adaptateur pour rapprocher la région active C-terminale de son site de fixation ou d'action.

Ces adaptateurs sont actuellement fortement recherchés pour compléter les mécanismes de transduction des signaux entre les sites de
30 fixation et leurs effecteurs.

Le fait d'utiliser la région C-terminale seule (7 à 10 acides aminés C-terminaux) pourrait court-circuiter tout le mécanisme de transduction du signal en agissant directement sur les pompes couplées à un récepteur.

L'invention a également pour objet un anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé spécifiquement contre la sorbine humaine, ou un fragment dudit anticorps capable de se lier spécifiquement à la sorbine humaine.

5 De manière préférentielle, les anticorps selon l'invention sont spécifiques de l'extrémité N-terminale et en particulier de la portion des acides aminés 40 à 45 de cette extrémité N-terminale de la sorbine humaine.

Des anticorps polyclonaux peuvent être obtenus à partir du sérum d'un animal immunisé contre la sorbine humaine selon l'invention selon
10 les modes opératoires usuels.

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein (Nature, (1975), vol. 256, pp. 495-497).

Les anticorps ou fragments d'anticorps de l'invention sont par
15 exemple des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab et F(ab')₂. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués. Par exemple, ils peuvent être associés à une toxine, telle la toxine diphtérique ou à un produit radioactif.

Les anticorps ainsi produits peuvent être notamment utilisés pour
20 détecter et/ou doser la sorbine humaine dans tout échantillon biologique susceptible d'en contenir.

L'invention a donc également pour objet un procédé de détection et/ou de dosage immunologique de la sorbine humaine dans un échantillon biologique dans lequel :

25 i) on met en contact ledit échantillon biologique avec un anticorps tel que défini précédemment, marqué de manière détectable ;

ii) on observe la formation d'un complexe anticorps-sorbine humaine, indicateur de la présence de sorbine humaine dans ledit échantillon.

Les anticorps de l'invention peuvent donc être avantageusement
30 mis en œuvre dans toute situation où l'expression de la sorbine humaine doit être observée.

Les figures et exemples ci-dessous illustrent l'invention sans en limiter la portée.

LEGENDES DES FIGURES

- La figure 1 représente une comparaison entre la séquence protéique de la sorbine porcine traduite à partir de l'ADNc (haut) et la séquence de la sorbine obtenue par séquençage protéique (bas). Le degré d'homologie est présenté entre les deux séquences (milieu). Les modifications apportées sont : (W16T), (D35K), (W112R).

- La figure 2 représente une comparaison entre les séquences nucléotidiques de la sorbine porcine (haut) et humaine (forme courte, en bas). Les différentes variations de séquences ont été confirmées par séquençage sur plusieurs clones issus de différents tissus du tube digestif humain.

- La figure 3 représente une comparaison des séquences protéiques de la sorbine humaine (haut) et porcine (bas) traduite à partir de l'ADNc.

- La figure 4 représente des coupes de tumeur carcinoïde de l'intestin grêle exprimant à la fois la protéine et les transcrits de la sorbine :

a) Révélation des cellules immunoréactives à l'anticorps Ac 93-128 YC-17,T5. Révélation à la diamino benzidine. Les cellules positives sont localisées dans la couche périphérique du nodule tumoral.

b) Hybridation *in situ* utilisant la sonde G C4-C3 antisens, ayant la séquence nucléotidique 316-459 de la sorbine porcine (nucléotides 316 à 459 de SEQ ID n° 1). Sonde marquée à la digoxigénine. Révélation streptavidine-biotine, chromogène AEC. Les sites d'hybridation sont nombreux et ils sont observés dans des cellules qui contiennent de la sorbine.

- La figure 5 représente des coupes de jéjunum humain normal.

a) Hybridation *in situ* utilisant la sonde G (C4-C3 antisens). Sonde marquée à la digoxigénine. Révélation streptavidine-biotine, chromogène AEC. Certaines cellules des cryptes hybrident avec la sonde de la sorbine. Trois cellules marquées sont indiquées par trois flèches.

b) Révélation des cellules immunoréactives à l'anticorps Ac 93-128 YC-17,T5. Révélation à la diamino benzidine des coupes adjacentes à celles utilisées pour l'hybridation *in situ*. Une des cellules qui hybride est révélée par l'anticorps.

5 c) Hybridation *in situ* utilisant la sonde G (sens) comme témoin négatif. Sonde marquée à la digoxigénine.

EXEMPLES

EXEMPLE 1 :

Clonage du gène de la sorbine porcine

MATERIELS ET METHODES

Extraction des ARN totaux

L'isolement des ARN totaux est réalisé par la technique au guanidium thiocyanate (Chomczynski et al.1987) qui utilise des agents chaotropiques détruisant toutes les structures cellulaires et libérant les ARN
20 nucléaires et cytoplasmiques, l'ADN et les protéines sont dénaturés. Une étape de purification est nécessaire, soit par ultracentrifugation, soit par extraction au phénol-chloroforme.

Les ARN totaux sont extraits à partir de tissus secs congelés. Le tissu (1 gramme) sec congelé est broyé jusqu'à homogénéisation à l'aide d'un
25 appareil Ultraturax en présence de 7,5 ml de solution de lyse.

Les homogénats sont déposés sur des coussins de chlorure de césium (CsCl 5,7 M et 2,4 M) et ultra-centrifugés pendant 16 heures à 30.10^3 rpm., à 20°C dans le rotor Beckman SW41.

Le culot translucide (contenant les ARN totaux) est repris dans
30 1ml d'eau distillée stérile, puis précipité avec 2,5 volume d'éthanol absolu. Le culot d'ARN est traité au DEPC 0,1% (diéthyl pyrocarbonate) à la concentration d'environ $2 \mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$.

Après calcul de la concentration des ARN, on réalise un contrôle qualitatif de l'extraction des ARN totaux par électrophorèse sur un grand gel d'agarose à 1% dans un tampon dénaturant de la manière suivante: 5 à 10 µg d'ARN totaux sont dénaturés à 65°C pendant 5 minutes dans une solution
5 contenant des agents dénaturants et du tampon MOPS (SIGMA). L'électrophorèse des ARN dénaturés est effectuée sur un grand gel horizontal d'agarose à 1% (contenant 6% de formaldéhyde) dans du tampon MOPS, sous une tension de 45 volts, à température du laboratoire pendant une nuit (Lehrach et al., 1977).

10

Technique de RT-PCR.

Devant la rareté des ARN messager de la sorbine et les difficultés pour les obtenir en quantités importantes, la technique d'amplification a été alors développée. Cependant, l'ARN ne pouvant pas lui-même servir de
15 matrice pour la PCR, une étape de transcription inverse en ADN complémentaire a été nécessaire.

Le choix des amorces a été basé sur la présence des acides aminés les moins dégénérés de la séquence protéique de la sorbine, à l'aide d'un logiciel (OLIGO). Les séquences retenues sont
20 SRB1(5')(AARGAYACNTAYAARAC) (acides aminés 14 à 19) et SRB 2 (3') (GGNCGYTCRTGYTGYAG)(acides aminés 142 à 147) car elles sont faiblement dégénérées et donnent une bande unique en PCR et RT-PCR : D'autres amorces non dégénérées ont été utilisées par la suite (tableau I).

Tableau I : Tableau contenant les amorces principales utilisées dans les RT-PCR.

SEQ ID	Désignation	Séquence	Orientation	Position
12	SRB1	AARGAYACNTAYAARAC	sens	42-57
13	S1	CGGCCGAAGGACTGGTA	sens	34-50
14	S2	ACAAGCCGAGATGATGAC	sens	83-99
15	S22	GTCTTCAACAGAAAAGCATGAC	sens	
16	SRB2	GGNCGYTCRTGYTGYAG	antisens	441-426
17	S4	GGATCCCAGTCATGCTT	antisens	341-325
18	S3	TGGATGACTTCCCAGGC	antisens	421-405
19	S48	GGGTCGTTCGTGCTGCAGGATGGATGA CTTCCCAGGCTCGTATTCAAA	antisens	441-394
20	C1	TGCTTGCGGTTTCGTGACGGG	antisens	459-439

5

Transcription inverse.

La quantité minimale d'ARN total nécessaire est de 1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$.

On prépare deux tubes Eppendorf de 1ml dont l'un contient l'amorce anti-sens (SRB 2) et l'autre l'amorce sens (SRB 1). On introduit dans chaque tube :

10

- 50 ng d'ARN total purifié,
- 2 μl (1/10 du volume total réactionnel) de tampon RT,
- 4 μl de dNTP (déoxyribonucléotides triphosphates),
- 1 μl d'amorce (50 $\text{pmol}.\mu\text{l}^{-1}$),
- eau distillée stérile,(qsp 18,5. μl).

15

L'ARN total est dénaturé par chauffage des tubes 6 min. au bain-marie 70°C, puis mis directement dans la glace. Après centrifugation 1 min. à $13.10^3 \text{ trs.min.}^{-1}$, on ajoute dans chacun des tubes 0,5 μl de Rnasin et 1 μl de transcriptase inverse MMLV. Le volume total de la réaction est complété à 20 μl et incubé 1 heure à 42°C.

20

PCR

Après la transcription inverse, dans chaque tube on ajoute:

- 8 μ l de tampon PCR,
- 4 μ l de dNTP,
- 1 μ l (50 pmol) de la seconde amorce,
- 0,5 μ l de Taq polymérase,
- eau distillée stérile qsp 100 μ l.

puis on ajoute deux gouttes d'huile minérale dans les tubes (pour éviter l'évaporation au cours de la réaction de PCR) et on introduit ceux-ci dans le thermocycleur qui est programmé pour 35 cycles avec :

- programme 1 : => dénaturation de 10 min. à 95°C,
 dénaturation de 1 min.,
- programme 2 : => hybridation de 1 min. à 42°C,
 élongation de 1 min. à 72°C,
- programme 3 : => élongation de 10 min. à 72°C,
- programme 4 : => conservation à 4°C.

Contrôle de la RT-PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

à 2%.

On ajoute dans chaque tube 100 μ l de chloroforme et on agite avec un Vortex pour émulsionner et éliminer l'huile minérale. On centrifuge 2 min. à 13.10^3 trs.min⁻¹, on récupère l'ADNc de chaque tube et on contrôle l'amplification sur un gel d'agarose à 2 %, avec un temps de migration de 20 min, à 100 volts et on observe le gel sous une lampe à rayon ultra violet à 254 nm.

Technique de sous-clonage.

La technique de sous-clonage a permis d'isoler et d'amplifier un fragment d'ADN en très grande quantité de manière monoclonale. Trois étapes principales ont été utilisées :

- isolement de l'ADN à insérer,
- recombinaison *in vitro* avec un vecteur.

- introduction du vecteur recombiné dans une cellule hôte compétente.

Préparation du vecteur de clonage.

5 Le vecteur de clonage utilisé est le plasmide Bluescript II SK +/- (Stratagene). La technique de préparation du vecteur comprend plusieurs étapes :

* étape 1 : hétérodigestion par les enzymes de restriction Eco RI et Hind III en vue de linéariser le vecteur pour la recombinaison.

10 * étape 2 : purification.

* étape 3 : déphosphorylation des extrémités 5' par l'action d'une phosphatase, ceci afin d'éviter que le vecteur se religue sur lui-même.

* étape 4 : purification.

15 * étape 5 : contrôle de la déphosphorylation par transformation bactérienne sur gélose plus antibiotique. Si le vecteur est bien déphosphorylé, il n'y a pas d'expression plasmidique et aucune bactérie ne pousse.

Préparation de l'insert.

20 L'insert utilisé est l'ADNc obtenu par RT-PCR et isolé par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%.

Purification de l'insert par le Kit GeneClean (Ozyme).

Sous la lampe à ultra violet (254 nm), on découpe délicatement le gel d'agarose avec des scalpels propres pour chaque bande et on récupère
25 une bande par tube Eppendorf (de 1,5 ml).

- On ajoute 2 volumes de solution de NaI et on place au bain-marie à 55°C pendant 5 min. L'utilisation du NaI permet de dissoudre l'agarose, d'augmenter la force ionique et, ainsi, de récupérer l'ADNc emprisonné par fixation des Na⁺ sur les phosphates de la molécule.

30 - On ajoute 10 µl de Glass Milk (Ozyme) (petits fragments de silice sur lesquels se fixe l'ADNc par liaisons hydrogènes) et on laisse agir 5 min. à température du laboratoire.

- On centrifuge 30 secondes à 13.10^3 trs.min.⁻¹, on élimine le surnageant et on fait trois lavages successifs avec la solution de lavage NEW Wash (Ozyme) :

5 lavage I : - on ajoute dans chaque tube 1 ml de NEW Wash,
- on centrifuge 2 min. à 13.10^3 trs.min.⁻¹,
- on élimine le surnageant,

10 lavage II : - on ajoute 500 µl de NEW Wash,
- on centrifuge 2 min. à 13.10^3 trs.min.⁻¹,
- on élimine le surnageant,

lavage III : - identique au lavage II.

15 On sèche le culot contenant l'ADNc, on reprend l'ADNc sec avec
50 µl d'eau distillée stérile et on met les tubes Eppendorf 5 min. au bain-marie à 55°C. Le rôle de l'eau distillée est de décrocher l'ADNc fixé sur les fragments de silice car il n'y a plus de force ionique et la chaleur permet d'abaisser la force des liaisons hydrogène entre l'ADNc et le Glass Milk. Ainsi, l'ADNc est libéré.

20 - On vortexe et on centrifuge les tubes 1 min. à 13.10^3 trs.min.⁻¹ et on récupère l'ADNc pour l'hétérodigestion.

- Hétérodigestion par les enzymes de restriction Eco RI et Hind III.

On ajoute dans chaque tube :

25 - 10 µl de tampon B (tampon des enzymes de restriction),
- 2 µl d'enzyme Eco RI (à 20 unités),
- 2 µl d'enzyme Hind III (à 20 unités),
- eau distillée stérile qsp 100 µl du volume total réactionnel,
et on incube une nuit au bain-marie à 37°C.

30 On purifie de nouveau par le Kit GeneClean, puis on refait la même manipulation à partir de l'ajout de NaI.

L'hétérodigestion est contrôlée par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, et l'insert est ligaturé avec le plasmide BlueScript (recombinaison *in vitro*).

On introduit dans chaque tube :

- (volume calculé) μ l d'ADNc,
 - 1 μ l de plasmide (50ng) BlueScript linéarisé et déphosphorylé,
 - 1 μ l de tampon T4 ADN ligase (à -20°C),
 - 0,5 μ l d'enzyme T4 ADN ligase,
 - eau distillée stérile qsp 20 μ l de volume total réactionnel,
- et on laisse une nuit au bain-marie à 16°C.

Préparation des bactéries compétentes.

La souche bactérienne utilisée est : *Escherichia coli* souche HB101.

a) Préculture.

Sous la hotte à flux laminaire; on prélève, à l'aide d'une pipette Pasteur munie d'embout stérile, une goutte d'une souche bactérienne de culture congelée et on ensemence un tube de 4 ml de milieu de culture L.Broth (LB, Gibco-BRL). On incube une nuit à 37°C sous agitation.

b) Culture.

Sous la hotte, on ensemence 500 μ l de préculture dans un erlenmeyer de 250 ml de milieu de culture LB et on incube 2,30 heures, à l'étuve 37°C sous agitation. On contrôle régulièrement la croissance bactérienne par la mesure de la DO à 600 nm (environ toutes les 30 min.) car celle-ci ne doit pas dépasser la valeur 0,3 qui correspond à la phase de croissance exponentielle. (Généralement, cette valeur est atteinte au bout de 2,30 heures de culture).

- Quand la DO = 0,3, on arrête la culture bactérienne en sortant l'erlenmeyer de l'étuve en le mettant dans la glace. En effet, au delà de cette DO, les cellules bactériennes rentrent dans une phase stationnaire qui n'est plus favorable à la transformation à cause des sécrétions de toxines et de la

mort cellulaire. Puis on centrifuge 15 min. à 3000 trs.min⁻¹ à 4°C pour obtenir un culot bactérien.

c) Traitement de la paroi bactérienne.

5 On élimine le surnageant par retournement du tube et on ajoute au culot:

- 20% d'une solution de Tris CaCl₂ glacé (préalablement filtrée).

Le tube est placé 20 min. dans la glace.

- On centrifuge 15 min. à 3000 trs.min⁻¹ à 4°C, on élimine le surnageant, et on ajoute 10% de Tris CaCl₂. Le tube est placé à 4°C.

Transformation bactérienne.

Sous la hotte, on prépare des tubes stériles de 5 ml contenant :

- 300 µl de bactéries compétentes,
- 10 µl de plasmides recombinants,

et on place les tubes dans la glace pendant 20 min.

- On fait un choc thermique en mettant les tubes 2 minutes dans un bain-marie à 42°C.

- On ajoute 500 µl de milieu LB par tube et on met 1 heure au bain-marie à 37°C.

- On ajoute 4 ml de milieu Top (LB de Gibco-BRL et Agar à 7 g/1000 ml de Difco-USA) en surfusion par tube et on étale chaque tube sur une boîte de pétri contenant de la gélose, préalablementensemencée avec de l'ampicilline.

Analyse des clones recombinants.

30 Sous la hotte à flux laminaire, on prélève 10 colonies pour chaque boîte et on les ensemence dans 4 ml de milieu LB. (auquel on a préalablement ajouté 40 µl d'ampicilline concentrée 100x). Le mélange est laissé incuber une nuit à l'étuve 37°C.

Réalisation d'une microamplification.

1 : extraction phénolique.

5 - On transvase le contenu de chaque tube amplifié dans des tubes Eppendorf qui sont centrifugés 2 min. à 13.10^3 trs.min.⁻¹ pour précipiter les bactéries.

- On aspire le surnageant avec une pipette Pasteur reliée à une pompe à vide et on ajoute 100 µl de phénol par tube, puis on vortexe. Ce traitement permet l'extraction de tous les acides nucléiques (ADN et ARN
10 bactériens, et ADN recombinant) par dénaturation des protéines avec le phénol.

- On ajoute 100 µl de TNE (Tris Natrium EDTA, le Tris provenant de Boehringer, le sodium NaCl de Merck et l'EDTA de Merck), on vortexe 5 min. et on centrifuge 2 min. à 13.10^3 trs.min.⁻¹. L'EDTA permet d'inhiber les
15 DNases et le sodium permet d'avoir une force ionique, le tout assure ainsi la conservation des acides nucléiques.

2 : précipitation éthanolique.

- On reprend 80 µl de surnageant de chaque tube dans de
20 nouveaux Eppendorfs et on ajoute 2 volumes d'éthanol absolu à -20°C. On laisse 5 min. à -80°C.

- On centrifuge 10 min. à 4°C à 13.10^3 trs.min.⁻¹, on élimine le surnageant et on met le culot d'ADN recombinant à sécher.

3 : hétérodigestion de l'ADN recombinant par les enzymes de restriction Eco RI et Hind III.

On reprend le culot d'ADN recombinant avec 50 µl d'eau distillée stérile et on prépare des tubes Eppendorf.

Dans chaque tube on ajoute :

- 30
- 10 µl d'ADN,
 - 2 µl de tampon B (tampon des enzymes de restriction),
 - 1 µl d'enzyme Eco RI (10 unités),
 - 1 µl d'enzyme Hind III (10 unités),

- eau distillée stérile qsp 20µl,
et on incube au bain-marie à 37°C pendant 1 heure.

**4 : contrôle de l'hétérodigestion par électrophorèse sur gel
d'agarose à 2 %.**

On ajoute 2 µl de tampon de charge dans chaque tube et on charge le gel. Temps de migration : 30 minutes à 100 volts.

Réalisation d'une macroamplification.

Sous la hotte, chaque tube de mini-préparation positif est ensemencé dans des erlenmeyers de 1l contenant :

- 200 ml de milieu de culture LB.,
- 2 ml d'ampicilline 100x,
- 5 gouttes du tube de mini-préparation
et incubé une nuit à 37°C sous agitation.

1: digestion de la paroi bactérienne

- On transvase le contenu de chaque erlenmeyer dans des pots spécifiques pour la centrifugeuse réfrigérante et on centrifuge 15 min. à 4000 trs.min.⁻¹ à 4°C. On élimine le surnageant, on ajoute 2 ml de solution I (contenant du lysozyme) par pot, on homogénéise et on laisse agir 5 min. à température du laboratoire.

- On ajoute 4 ml de solution II par pot, on agite pour avoir une consistance visqueuse et on laisse agir 5 min. dans la glace.

- On ajoute 3 ml de solution III par pot, on homogénéise et on laisse agir 15 min. dans la glace.

- On centrifuge 15 min. à 8000 trs.min.⁻¹ à 4°C, on filtre le surnageant de chaque pot et on le transvase dans des tubes en verre.

2 : précipitation alcoolique.

- On ajoute 4,5 ml de 2-propanol par tube et on laisse 30 min. à -80°C.

- On centrifuge 20 min. à $12500 \text{ trs.min}^{-1}$ à 4°C (en prenant soin de mettre les tubes dans des réducteurs de protection en caoutchouc), on élimine le surnageant et on égoutte les tubes sur du papier filtre.

- On sèche pour éliminer toutes traces d'alcool.

5

3 : digestion enzymatique.

- On reprend les culots d'ADN avec 3 ml d'eau distillée.

- RNase : on ajoute 10 μl de RNase par tube et on laisse agir 30 min. au bain-marie 37°C . Ici, la RNase permet la digestion de l'ARN bactérien.

10

- Protéinase K : on ajoute 10 μl de protéinase K par tube et on laisse agir 30 min. au bain-marie 37°C . Cette réaction enzymatique permet la digestion de toutes les protéines.

4 : Ultracentrifugation en gradient de chlorure de césium.

15

Dans chaque tube, on ajoute :

- 3,75 g de CsCl (chlorure de césium),

- 1 μl de BET (bromure d'éthidium),

les tubes sont ultracentrifugés à $50.10^3 \text{ trs.min}^{-1}$ à 20°C pendant une nuit. On obtient alors un anneau d'ADN rose visible sous la lumière ultra violette.

20

- On récupère délicatement l'anneau d'ADN recombinant rose (dans des tubes de 10 ml) à l'aide d'une seringue, en piquant sous l'anneau et en aspirant doucement. On ajoute un volume d'eau distillée stérile par tube et on complète à 10 ml avec de l'alcool isoamylique. On homogénéise par des retournements énergiques pendant 3 min.

25

- On centrifuge 5 min. à $3000 \text{ trs.min}^{-1}$ à 15°C (afin d'éliminer tout le BET par l'alcool isoamylique) et on récupère les plasmides recombinants avec une pipette Pasteur munie d'une poire (on utilise une pipette par tube).

30

5 : précipitation éthanolique.

- On ajoute 2 volumes d'éthanol 100° et on laisse agir 30 min. à -80°C . (aspect laiteux des tubes).

6 : Lavages.

- On centrifuge 15 min. à 12500 trs.min⁻¹ à 4°C pour séparer le sel de l'ADN recombinant, on écarte le surnageant et on ajoute 2 ml d'eau distillée stérile pour éliminer le CsCl.

5 - On ajoute 2 volumes d'éthanol absolu froid (-20°C) pour précipiter l'ADN et on laisse agir 30 min. à -80°C.

- On centrifuge 15 min. à 4°C à 12500 trs.min⁻¹, on élimine le surnageant et on égoutte les tubes sur le papier filtre.

10 - Les tubes sont séchés 10 min. au speed vac pour éliminer toutes les traces d'éthanol et les culots secs sont repris avec 100 µl d'eau distillée stérile.

7 : dosage de l'ADN au spectrophotomètre à 260nm.**15 8 : séquençage selon la méthode de Sanger modifié.**

On prépare des tubes Eppendorf comme indiqué ci-après :

- 5 µl d'ADNc (insert à 1 µg.µl⁻¹)

(volume ajusté en fonction du dosage spectrophotométrique).

- 2 µl de NaOH à 2N,

20 - eau distillée stérile qsp 20 µl,

et on laisse 20 min. à température du laboratoire.

On neutralise par l'acétate de sodium puis on réalise une précipitation éthanolique :

25 On ajoute 75 µl d'éthanol absolu froid (-20°C), on laisse agir 20 min. à -80°C et on centrifuge à 13.10³ trs.min⁻¹. On sèche pour éliminer toute trace d'éthanol.

Hybridation :

Dans chaque tube, on ajoute :

30 - 2 µl de tampon d'hybridation (5X)

- 0,5 µl d'amorce (10 pmol.),

- 7,5 µl d'eau distillée stérile,

et on laisse 20 min. au bain-marie à 37°C.

Amorçage de la réaction de polymérisation :

On ajoute :

- 1 µl de DTT,
- 2 µl de tampon d'hybridation ("GTP labelling mix",
- 5 USB/Amersham (dilué 5X)),
- 0,5 µl de $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP,
- 1,5 µl de sequenase (diluée au 1/6),

on homogénéise et on laisse agir 5 min. à température du laboratoire.

- 10 - On transfère 3,5 µl de ce mélange dans 4 tubes Eppendorf contenant chacun un ddNTP (didéoxyribonucléotide) différent (4 réactions différentes), et on laisse agir 5 min. au bain-marie à 37°C. Ici, l'élongation des chaînes est arrêtée lors de l'incorporation des ddNTP car ceux-ci ne peuvent pas former de liaisons phosphodiester avec les dNTP suivants.

- 15 On arrête la réaction en ajoutant 5 µl de solution "stop" (contenant un colorant et de la formamide, (Amersham)) par tube Eppendorf et on place immédiatement les tubes dans la glace.

Chargement du gel de polyacrylamide.

- 20 Les tubes sont chauffés à 80°C, puis placés immédiatement dans la glace. Le gel est chargé avec des dépôts de 2 à 4 µl par puits. On laisse migrer 1,20 à 3 heures pour des fragments de 100 pb, à 1450 volts.

- 25 **Arrêt de l'électrophorèse, exposition et révélation par autoradiographie.**

a) Arrêt de l'électrophorèse.

- 30 Les électrodes sont débranchées, le tampon de migration est éliminé et les plaques de verre contenant le gel séquence sont retirées. Le gel est récupéré et une feuille de papier Watman® 3M est disposée sur celui-ci en tapotant pour bien le faire adhérer et le gel fixé sur le papier est déposé sur une feuille de film plastique (Cellofray®) pour le protéger. Le gel séquence est mis à sécher 2 heures à 80°C sous vide.

b) Exposition du gel sur un film autoradiographique.

Après séchage, le Cellofray® est retiré et un film autoradiographique (Hyper film-MP®, Amersham) est appliqué. Puis
5 l'ensemble est disposé dans une cassette (munie d'un écran intensificateur) pour une exposition de une nuit à plusieurs jours à -80°C, car les films sont plus sensibles dans le froid.

c) Révélation du film autoradiographique.

10 La révélation se fait à la lumière rouge et consiste à passer le film autoradiographique dans différents bains :

- 2 min. dans le révélateur dilué au 1/5 (ILFORD 2000 RT),
- rinçage dans l'eau,
- 5 min. dans le fixateur dilué au 1/5 (ILFORD 2000 RT),
- 15 - 15 min. de rinçage à l'eau courante,
- séchage et lecture du film.

Préparation et marquage des sondes.**Marquage d'une sonde.**

Pour détecter la présence d'une séquence complémentaire, par hybridation, au sein d'un mélange de fragments d'ADN, les sondes d'ADN dénaturées, sont marquées radioactivement au ^{32}P -dCTP (dans les conditions
25 préconisées par le fournisseur), par la technique d'amorçage multiple ("random priming"). Les sondes obtenues ont une activité spécifique de 0,2 à 1.10^9 cpm. μg^{-1} .

On dénature 2 min. à 80°C, 30 ng de fragments d'ADNc pur (sonde) dans un volume final de 45 μl d'eau distillée stérile et on met le tout
30 directement dans la glace.

- On introduit ensuite les 45 μl de sonde dénaturée dans un lyophilisat (Kit Rediprime DNA , USB) contenant :
- le tampon de la polymérase Klenow,

- les dNTP (moins le dCTP),
- les amorces octanucléotidiques de synthèse,
- la polymérase Klenow,

et on rajoute 5 µl de radioactivité ^{32}P -dCTP. On incube 10 min.

5 au bain-marie 37°C pour la polymérisation selon le principe de l'amorçage multiple ("random priming").

Hybridation moléculaire des sondes marquées avec une membrane.

10

Northern blot et Southern blot.

Le Northern blot est une technique permettant de détecter un transcrit au sein d'un mélange complexe. La taille de l'ARN peut être déterminée par le degré de sa migration dans le gel et son abondance par l'intensité de la bande (ou signal). Cette méthode est très utilisée pour étudier les anomalies de la transcription d'un gène. Elle se réalise en plusieurs étapes:

15

- transfert du profil électrophorétique sur une membrane de Nylon,

20

- préhybridation,
- hybridation,
- lavage,
- révélation par autoradiographie.

Transfert.

25

Après une électrophorèse réalisée avec 5 à 10 µg d'ARN total dénaturé (sur un gel dénaturant à 1% en agarose), on fait un transfert de ceux-ci sur un filtre de Nylon (Hybond N Amersham) en présence de tampon phosphate. Le transfert dure une nuit à température du laboratoire et se fait grâce au phénomène de capillarité.

30

Préhybridation et hybridation.

La membrane est séchée durant 3 heures à 80°C avant l'hybridation pour fixer l'ADN, de manière irréversible.

Dans un sac plastique scellé (contenant la membrane) on introduit 10 ml de solution d'hybridation avec 150 µl d'ADN de sperme de saumon dénaturé (2 min. à 80°C). On incube le sac 3 à 6 heures à 42°C sous agitation.

- 5 - Hybridation : On ouvre le sac avec précaution et on introduit 50 µl de sonde dénaturée (2 min. à 80°C) et marquée au ^{32}P -dCTP. On incube une nuit à l'étuve 42°C, sous agitation.

Lavages.

- 10 Après hybridation, le mélange est éliminé du sac plastique et le filtre est lavé dans différents bains :

- 1 rinçage rapide dans une solution de 2XSSC à température ambiante.

- 1 rinçage dans une solution de 2XSSC à 65°C durant 45 min.

- 15 - 1 rinçage de 45 min. à 65°C sous agitation dans une solution de 2XSSC + SDS 0,5 %.

- 1 rinçage de 45 min. à 65°C sous agitation dans une solution de 0,2XSSC + SDS 0,5 %.

20

Révélation par autoradiographie.

Le filtre est ensuite séché et exposé pour autoradiographie sur film (Hyper film-MP®, Amersham) dans une cassette avec un écran intensificateur. L'exposition dure de quelques heures à plusieurs jours à -80°C.

25

RESULTATS

- 30 Les auteurs de la présente invention ont réalisé un criblage de la banque d'expression de cDNA sur le duodénum et le jéjunum de porc avec un antiserum anti sorbine. Ce criblage n'a pas permis de continuer la recherche dans cette banque. En revanche, l'amplification par RT-PCR en présence d'amorces dégénérées dans les régions les moins dégénérées, s'est révélée positive en donnant plusieurs fragments amplifiés à partir d'ARN de jéjunum et de duodénum . Tous ces fragments ont été clonés, séquencés et comparés

avec les banques de données. Les auteurs de la présente invention ont fait varier les différents paramètres de la PCR pour optimiser la spécificité des amorces. Ceci a permis d'amplifier une partie de la séquence de la sorbine. Le fragment de la sorbine confirmé par séquençage a servi ensuite comme sonde
5 pour cribler la banque d'expression réalisée à partir des même ARN. Plusieurs clones ont été purifiés et séquencés.

Le clonage de l'ADNc de la sorbine a permis de rectifier la séquence protéique de la sorbine, dans sa région N terminale (fig. 1).

10

EXEMPLE 2 :

Clonage du gène de la sorbine humaine

MATERIELS ET METHODES

15

Les conditions de PCR utilisées sont identiques à celles décrites dans l'exemple 1.

Le gène de la sorbine humaine a été isolé au moyen d'une sonde préparée à partir de l'ADNc complet (459 paires de bases) codant pour la
20 sorbine porcine.

Au préalable, des études en immunohistochimie et en hybridation *in situ* ont été réalisées.

Immunohistochimie

25

Le protocole mis en œuvre est similaire à celui décrit dans l'article de Fatima Abou El Fadil, 1997.

L'antisérum utilisé, désigné 93-I28 Y C17, a été produit par inoculation du peptide contenant les acides aminés 137 à 153 de la sorbine porcine auquel a été ajoutée une tyrosine en position 1, à un lapin, comme
30 décrit dans l'article cité ci-dessus.

Hybridation *in situ*.

I - Principe de l'hybridation *in situ*.

L'hybridation *in situ* permet de visualiser un ARNm (transcrit d'un gène) au niveau cellulaire, soit sur des coupes histologiques, soit sur des suspensions cellulaires, par l'utilisation d'une sonde marquée (à chaud ou à froid). En effet, cette technique est basée sur la propriété d'appariement spécifique (avec une forte affinité) de deux séquences nucléotidiques complémentaires. Elle se déroule en 6 étapes :

- * marquage de la sonde,
- * prétraitement,
- * hybridation,
- * lavages,
- * révélation,
- * observations au microscope optique.

II- But de son utilisation.

L'intérêt de son utilisation dans le cas de l'étude de la sorbine, est de localiser au niveau cellulaire, l'ARNm correspondant à la sorbine sur des coupes histologiques de vipôme pancréatique, de pancréas sain et de carcinoïde intestinal, et par là-même, de confirmer le marquage nucléaire et immunocytoologique obtenu parallèlement. Pour cela, on utilise les sondes marquées à la digoxigénine-11-dUTP selon la méthode de l'amorçage multiple ("random priming").

III- Technique.

III-1- Marquage des sondes à la digoxigénine.

Il se fait par la méthode d'amorçage multiple avec le Kit Rediprime DNA. On réalise le marquage des sondes froides avec le dUTP-digoxigénine .

III-2- Préparation des lames.

- On lave les lames à l'eau du robinet, puis on les immerge une nuit dans de l'alcool chlorhydrique.

- On lave 3 à 4 heures dans l'eau courante, on rince à l'eau distillée et on sèche à l'étuve 40°C.

- On étale sur chaque lame une goutte de poly-L-lysine (à 1% diluée dans de l'eau distillée) à l'aide d'une autre lame comme un frottis. On fait sécher les lames à l'air (à l'abri de la poussière) et on les incube une nuit à l'étuve 60°C.

III-3- Préparation des coupes.

a) Traitement du bloc.

On fait des coupes sériées avec le pancréas sain, le vipôme et le carcinoïde intestinal. Celles-ci sont réalisées au microtome à 3-4 μ m, avec un couteau jetable. Puis, elles sont recueillies sur les lames propres traitées à la poly-L-lysine, en déposant une goutte d'eau distillée stérile à la surface de celle-ci. Ensuite, on égoutte l'excès d'eau et on sèche 1 heure sur une platine chauffante. On incube les lames une nuit à l'étuve 60°C. Par la suite, on peut soit les traiter soit les conserver sur un portoir emballé dans de l'aluminium et mis à 37°C.

b) Déparaffinage et réhydratation des coupes.

But : débarrasser le tissu du milieu d'inclusion.

Technique : les coupes sont plongées dans des bains d'alcool de degré croissant :

- 3 fois 5 min. dans du xylène,
- 2 fois 2 min. dans l'éthanol 100°,
- 2 fois 2 min. dans l'éthanol 95°,
- réhydratées 2 fois 5 min. dans du PBS (phosphate buffer saline à 150 mmol.l⁻¹).

c) Prétraitements.

Ils servent essentiellement à améliorer le rapport signal/bruit de fond et la réponse d'hybridation. Il en existe un certain nombre dont :

5 * Hydrolyse chimique.

But : elle permet de dénaturer l'ADN pour rendre l'ARNm plus accessible à la sonde.

Technique : On trempe les lames dans un bain-marie d'HCL 0,2N pendant 12 min. et on rince 2 fois 5 min. dans du PBS.

10 * Hydrolyse enzymatique à la protéinase K.

But : ce traitement permet la digestion de toutes les protéines, ce qui entraîne alors une perméabilisation du matériel et augmente la pénétration de la sonde dans le tissu.

15 **Technique** : les lames sont trempées dans 100 ml de protéinase K (à 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ dans du Tris EDTA pH 7,4) pendant 10 min. à 37°C.

 * Blocage des peroxydases endogènes.

20 **But** : éviter l'interaction des peroxydases tissulaires avec l'utilisation de la streptavidine peroxydase biotinylée, lors de la révélation.

Technique : les lames sont plongées 5 min. dans H_2O_2 (à 3% dans du PBS) et rincées 2 fois 5 min. dans du PBS.

 d) Contrôle par les RNases.

25 **But** : il s'agit de réaliser un témoin négatif qui permettra d'affirmer, lors de l'étude des résultats, que le signal observé sur les lames ne correspond pas à un artefact.

30 **Technique** : les lames sont plongées dans 100 ml de RNases (à 100 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ dans du 2XSSC) pendant 30 min. à 37°C et lavées dans du 2XSSC pendant 15 min. à température ambiante.

e) Déshydratation.

Technique : les coupes sont passées dans des bains d'alcool de degré croissant :

- 1 bain d'éthanol 70° pendant 1 min.,
- 1 bain d'éthanol 80° pendant 1 min.,
- 1 bain d'éthanol 100° pendant 10 min.,
- séchage à l'air libre.

III-4- Hybridation.a)- Dénaturation de la sonde.

But : c'est une étape indispensable pour avoir des sondes monobrins car celles-ci obtenues par génie génétique, sont encore bicaténares (et ne peuvent donc pas être utilisées pour l'hybridation).

Technique : dans 20 µl de solution d'hybridation (préparée extemporanément), on ajoute la sonde pour obtenir 10 ng.ml⁻¹, on la met 5 min. à 75°C et on la plonge immédiatement dans la glace.

Remarque :

* La concentration de la sonde peut être ajustée en fonction de la longueur. Pour des sondes inférieures à 1Kb, la concentration peut atteindre 20 µg.ml⁻¹.

b) Hybridation.

Technique : on dépose les 20 µl de la sonde dénaturée sur la lame. On pose une lamelle et on laisse incuber dans une chambre humide, à 42°C, pendant 16 heures, à l'abri de la poussière.

III-5- Lavages.

But : ils servent à éliminer l'excès de sonde, les hybrides partiels et aspécifiques. Pour cela, les coupes subissent des lavages dans des conditions de stringence croissante (c'est-à-dire concentration décroissante de sels et augmentation de la température) qui assureront la dissociation des hybrides partiels et non spécifiques.

Technique : les lames sont plongées dans des bains successifs :

- 1 bain de 4XSSC (qui permet de décoller les lamelles),
- 1 bain de 1XSSC de 15 min. à température ambiante,
- 1 bain de 1XSSC de 30 min. à température ambiante,
- 1 bain de 1XSSC de 15 min. à 42°C,
- 5 - 1 bain de 1XSSC de 30 min. à 42°C,
- 1 bain de 0,1XSSC de 30 min. à 42°C.

III-6- Révélation.

Il s'agit d'une méthode indirecte faisant appel à des procédés
10 d'immunocytologie basés sur des réactions antigènes-anticorps ou ligand-
antiligand.

a) Saturation des sites tissulaires de biotine endogène.

But : ces sites sont saturés pour éviter de fixer la streptavidine
15 exogène lors de la révélation. Pour cela, on utilise les protéines du lait.

Technique : on prépare extemporanément, du tampon STMT
(Sodium-Tris-Magnésium-Tween, le Magnésium provenant de Sodipro et le
Tween de Sigma) 1mol.l⁻¹ avec 1% de lait écrémé (pH 7,5) et on rince :

- 1 rinçage d'une heure au bain-marie 37°C,
- 20 - 1 rinçage de 15 min. à température ambiante.

b) Détection de la digoxigénine.

Technique : on dépose sur chaque coupe :

- 200 µl de sérum normal de chèvre (dilué au 1/20 dans du TBS
25 de Sigma) et on laisse 30 min. à température ambiante, en chambre humide (à
l'abri de la poussière).

- 200 µl d'anticorps monoclonal anti-digoxigénine (dilué au 1/30
dans du TBS + 1% de SAB 30%) et on laisse 30 min. en chambre humide à
température ambiante.

30 - on rince 2 fois 5 min. dans du TBS.

- 200 µl de sérum de chèvre anti-souris biotinylée (Kit DAKO) et
on laisse 30 min., en chambre humide, à température du laboratoire.

- on rince 2 fois 5 min. dans du TBS.

- on ajoute quelques gouttes de streptavidine peroxydase biotinylée et on laisse 30 min., en chambre humide, à température du laboratoire.

- la révélation de l'activité peroxydasique est réalisée avec le coffret AEC DAKO chromogène rouge, dans le noir.

- une contre-coloration à l'hémalum peut être réalisée.

c) Contrôles.

Un signal observé sur une lame nécessite la vérification avec d'autres lames témoins pour affirmer la spécificité de la réponse.

Ainsi, selon les traitements effectués sur les lames, on obtient :

- traitement en l'absence de sonde : les marquages sont liés à la présence de la biotine endogène.

- traitement en présence de RNase : pas d'hybridation *in situ*.

RESULTATS

Dans un premier temps, la sorbine a été recherchée dans des tumeurs gastro-intestinales et pancréatiques, par immunohistochimie avec des anticorps spécifiques de la région active C-terminale de la sorbine. Les tumeurs positives en immunohistochimie ont été utilisées en RT-PCR. Après extraction des ARNs et amplification, la présence de la sorbine a été confirmée par la présence d'une bande de la taille attendue et par séquençage. Les fragments considérés comme parasites et qui ne correspondaient pas à la bonne taille ont été également séquencés. Leurs séquences ne correspondaient pas à la sorbine et n'avaient pas d'homologie dans les banques de données.

L'hybridation *in situ* avec des sondes de la région C-terminale montre que seulement certaines cellules endocrines expriment ce peptide à l'état normal ainsi que les couches cellulaires périphériques de certaines tumeurs intestinales et pancréatiques.

Les études en immunohistochimie et en hybridation *in situ*, réalisées sur les mêmes coupes histologiques des mêmes tumeurs ont montré

une très forte corrélation des cellules endocrines exprimant la sorbine (Figure 4).

La même corrélation entre les résultats obtenus par les 2 techniques a été retrouvée dans le jéjunum humain normal (figure 5).

5

Deux formes ont en fait été obtenues par RT-PCR :

- une forme courte proche de la sorbine porcine a été obtenue par RT-PCR sur un gros intestin humain normal ;

10

- une forme longue avec une région centrale différente de la sorbine porcine a été obtenue par RT-PCR à la fois dans un tissu de tumeur gastro-intestinale et dans un tissu normal.

Les séquences protéiques de la sorbine humaine courte et de la sorbine porcine traduites à partir des ADNc ont été comparées (figure 3).

REFERENCES

5 Abou El Fadil F., Sorbin in the porcine gastrointestinal tract and pancreas : an immunocytochemical analysis. *Endocrinology*, vol 138 , n° 11, 1997.

 Charpin G., Chikh-Issa AR., Guignard H., Jourdan G., Dumas C.,
10 Pansu D., Descroix-Vagne M, Effect of sorbin on duodenal absorption of water and electrolytes in the rat. *Gastroenterology* 103:1568-1573, 1992.

 Chomczynski P. and Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.*
15 *Biochem.* 162: 156-159, 1987.

 Eto B., Griesmar B., Desjeux JF. Effect of sorbin on electrolyte transport in rat and human intestine. *Am. J. Physiol.*, 1999 ; 276 (*Gastrointest. Liver. Physiol.* 39) :G107-G114.

20 Grishina O., Charpin G., Marquet P., Pansu D., Descroix-Vagne M. Effet des dérivés C-terminaux de la sorbine sur les flux ioniques duodénaux chez le rat. *Gastroenterol. Clin. Biol.*, 1995 : 19:487-93.

25 Lehrach H., Diamon D., Wozney J.M. and Boedker H. RNA molecular weight determination by gel electrophoresis under denaturing conditions: a critical reexamination. *Biochemistry* . 16: 4743-4751, 1977.

 Marquet F., Grishina O., Pansu D., Descroix-Vagne M., Effet des
30 dérivés C-terminaux de la sorbine sur les flux ioniques ileaux stimulés par le VIP chez le rat. *Gastroenterol Clin. Biol.*, 1994 ; 18:702-707.

Marquet F., Botella A., Bueno L., Pansu D., Descroix-Vagne M.
Effect of sorbin derivatives on cholera toxin-induced intestinal secretion in rat *in vivo*. *Peptides* 1998 : 19:1417-1423.

- 5 Vagne-Descroix M., Pansu D., Jörnvall H., Carlquist M., Guignard H., Jourdan G., Desvigne A., Collinet M., Caillet C., Mutt V., Isolation and characterisation of porcine sorbin, *Eur. J. Biochem.* 201:53-59, 1991.

REVENDICATIONS

1. Acide nucléique codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, ledit acide nucléique comprenant la séquence
5 nucléotidique choisie parmi :

a) la séquence SEQ ID n° 1 ;

b) la séquence SEQ ID n° 3 ;

c) la séquence SEQ ID n° 5 ;

10 d) une séquence nucléotidique homologue de la séquence SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 5 ; et

e) au moins un fragment nucléotidique desdites séquences a), b), c) ou d).

2. Acide nucléique selon la revendication 1, ledit acide nucléique
15 comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi la séquence SEQ ID n° 6 à 8 et une séquence nucléotidique homologue de la séquence SEQ ID n° 6 à 8.

3. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant une
20 séquence nucléotidique telle que définie dans l'une des revendications 1 ou 2.

4. Cellule hôte transformée par le vecteur selon la revendication 3.

25 5. Procédé de production de peptide recombinant possédant l'activité biologique de la sorbine, ledit procédé comprenant les étapes consistant à :

i) insérer une séquence nucléotidique telle que définie dans l'une des revendications 1 ou 2 dans un vecteur d'expression, ladite séquence
30 nucléotidique étant liée de manière opérante avec des éléments permettant la régulation de son expression ;

ii) transformer une cellule hôte avec le vecteur ainsi obtenu ;

iii) cultiver ladite cellule hôte dans des conditions permettant l'expression de ladite séquence nucléotidique ;

iv) recueillir le peptide recombinant exprimé ;

v) éventuellement purifier ledit peptide ;

5 vi) éventuellement procéder à une amidation du peptide produit.

6. Peptide recombinant isolé obtenu par le procédé selon la revendication 5.

10 7. Peptide recombinant possédant l'activité biologique de la sorbine et comprenant la séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID n° 2, SEQ ID n° 4 et SEQ ID n° 11.

15 8. Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 ou 2 ou un peptide selon l'une des revendications 6 ou 7.

9. Oligonucléotides comprenant les séquences SEQ ID n° 12 à SEQ ID n° 20 ou leurs séquences complémentaires.

20 10. Procédé de détection de l'expression de la sorbine dans un échantillon cellulaire ou tissulaire, comprenant les étapes consistant à:

- préparer l'ARN dudit échantillon ;

25 - mettre en contact ledit ARN obtenu avec une sonde ayant une séquence nucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement avec un acide nucléique codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, tel que défini à la revendication 1 ;

- détecter la présence d'ARNm hybridant avec cette sonde, indicatrice de l'expression d'un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine dans l'échantillon.

30

11. Procédé de détection de l'expression de la sorbine dans des cellules ou un tissu par hybridation *in situ*, comprenant les étapes consistant à:

- mettre en contact lesdites cellules ou ledit tissu avec une sonde ayant une séquence nucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement avec un acide nucléique codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, tel que défini dans la revendication 1 ;

5 - détecter la présence d'ARNm hybridant avec cette sonde, indicatrice de l'expression du peptide possédant l'activité biologique de la sorbine.

10 12. Anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé spécifiquement contre la sorbine humaine, ou fragment dudit anticorps capable de se lier spécifiquement à la sorbine humaine.

13. Procédé de détection et/ou de dosage immunologique de la sorbine humaine dans un échantillon biologique dans lequel :

15 i) on met en contact ledit échantillon biologique avec un anticorps tel que défini dans la revendication 12, marqué de manière détectable ;

 ii) on observe la formation d'un complexe anticorps-sorbine humaine, indicateur de la présence de sorbine humaine dans ledit échantillon.



1/5

MRAATPLQTVDRPKDWYKTMFKQIHMVHKPDDDDTDMYNTPTYTYNAGLYNSPYSAQSHPA
 MRAATPLQTVDRPKD YKTMFKQIHMVHKPDDDDT MYNTPTYTYNAGLYNSPYSAQSHPA
 MRAATPLQTVDRPKD TYKTMFKQIHMVHKPDDDDTKMYNTPTYTYNAGLYNSPYSAQSHPA

KTQTYRPLSKSHSDNGTDAFKDASSPVPPPHVPPVPPVPLRPRDRSSTEKHDWDPPDRKVD
 KTQTYRPLSKSHSDNGTDAFKDASSPVPPPHVPPVPPVPLRPRDRSSTEKHD DPPDRKVD
 KTQTYRPLSKSHSDNGTDAFKDASSPVPPPHVPPVPPVPLRPRDRSSTEKHDRDPPDRKVD

TRKFRSEPRSI FEYEPGKSSILQHERPVTKPQA-NH₂
 TRKFRSEPRSI FEYEPGKSSILQHERPVTKPQA-NH₂
 TRKFRSEPRSI FEYEPGKSSILQHERPVTKPQA-NH₂

FIG.1

ATGAGAGCAGCAACACCTTTGCAGACAGTTGACCGGCCGAAGGACTGGTACAAGACCATGTTTAAGCAAA
 IIII IIII IIIIIIIIIIIIIIIIIII IIIIIIIII IIIIIIIIIIIIIIIIIII IIIIIIIIIII
 ATGAAAGCAACAACACCTTTGCAGACAGTCGACCGGCCAAGGACTGGTACAAGACGATGTTTAAGCAAA

TCCACATGGTGCACAAGCCAGATGATGACACAGACATGTATAATACTCCT TATAC
 I IIIIIIIIIIIIIIIIIII IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII IIIII
 TTCACATGGTGCACAAGCCGGATGATGACACAGACATGTATAATACTCCTACACCTCACATGAAATATAC

ATATAATGCAGGCCTGTACAACCTACAGTGCTCAGTCACATCCTGCTGCCAAGACCCAGACCTAC
 III IIIIIIIII IIIIIIIII IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII IIIIIII IIIIIII IIIIIII
 ATACAATGCAGGTCTGTACAACCCACCCTACAGTGCTCAGTCACACCCTGCTGCAAAGACCCAAACCTAC

AGACCCCTCTCCAAAAGCCACTCTGACAATGGCACCAGCGCCTTTAAGGATGCTTCCTCACCTGTCCCTC
 IIIII II IIIIIIIIIIIIIIIII IIIII II II I IIIIIIIIIIIIIIIII IIIII II II IIII
 AGACCTCTTTCCAAAAGCCACTCCGACAACAGCCCCAATGCCTTTAAGGATGCGTCCTCCCAAGTGCCTC

CCCCACATGTTCCCTCCTCCAGTCCACCTCTGCGACCAAGAGATCGGTCTTCAACAGAAAAGCATGACTG
 IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII II II IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII
 CCCCACATGTTCCACCTCCAGTCCCGCGCTTCGACCAAGAGATCGGTCTTCAACAGAAAAGCATGACTG

GGATCCTCCAGACAGAAAAGTGGACACGAGAAAATTTTCGATCGGAGCCACGGTCTATTTTTGAATACGAG
 IIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIIII IIIII II I II IIIII II IIIIIIIIIIIIIIIIIII
 GGATCCTCCAGACAGAAAAGTGGACACAAGAAATTTTCGGGTCTGAGCCAAGGAGTATTTTTGAATACGAG

CCTGGGAAGTCATCCATCCTGCAGCACGAACGACCCGTCACGAAACCGCAAGCAGGGCGCCGTAAGGTC
 III I
 CCTGGGAAGTCATCCATCCTGCAGCACGAACGACCCGTCACGAAACCGCAAGCAGGGCGCCGTAAGTCC

FIG.2



2/5

MKATTP LQTVDRPKDWYKTMFKQIHMVHKPDDDDTDMYNTPTPHMKYTYNAGLYNPPYSAQ
M+A TPLQTVDRPKDWYKTMFKQIHMVHKPDDDDTDMYNTPTPHMKYTYNAGLYNPPYSAQ
MRAATPLQTVDRPKDWYKTMFKQIHMVHKPDDDDTDMYNTPTPHMKYTYNAGLYNPPYSAQ

SHPAAKTQTYRPLSKSHSDNSPNAFKDASSPVPPPHVPPPVPLRPRDRSSTEKHDWDPP
SHPAAKTQTYRPLSKSHSDN +AFKDASSPVPPPHVPPPVPLRPRDRSSTEKHDWDPP
SHPAAKTQTYRPLSKSHSDNGTDAFKDASSPVPPPHVPPPVPLRPRDRSSTEKHDWDPP

DRKVDTRNFGSEPRSFIEYEPGKSSILQHERPVTKPQA-NH₂
DRKVDTR F SEPRSFIEYEPGKSSILQHERPVTKPQA-NH₂
DRKVDTRKFRSEPRSFIEYEPGKSSILQHERPVTKPQA-NH₂

FIG.3



3/5

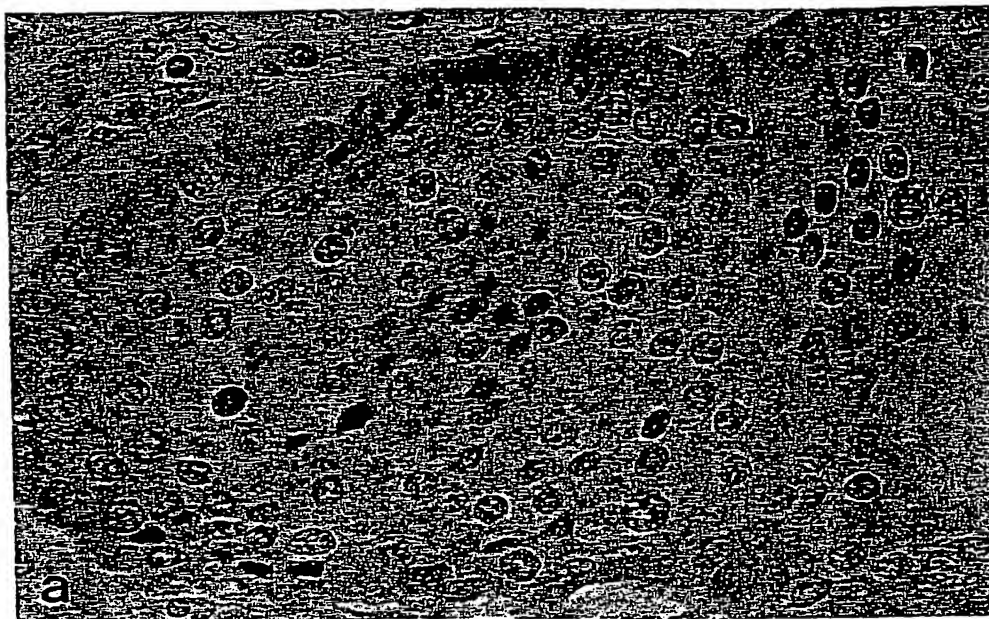


FIG.4A

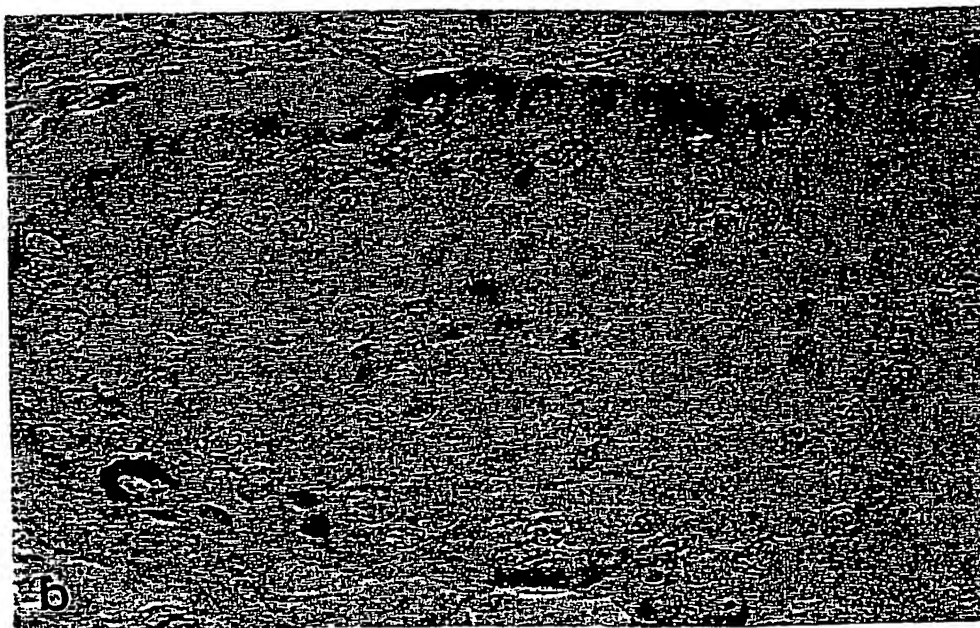


FIG.4B

4/5

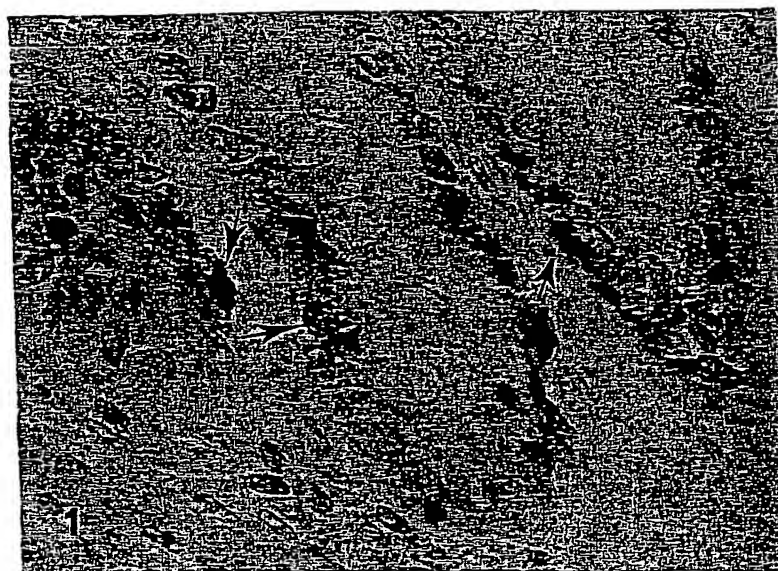


FIG.5A

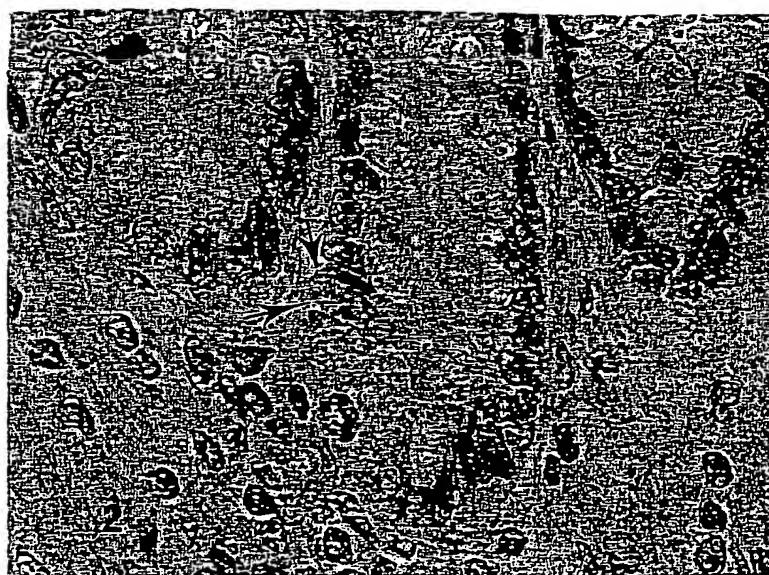


FIG.5B



5/5

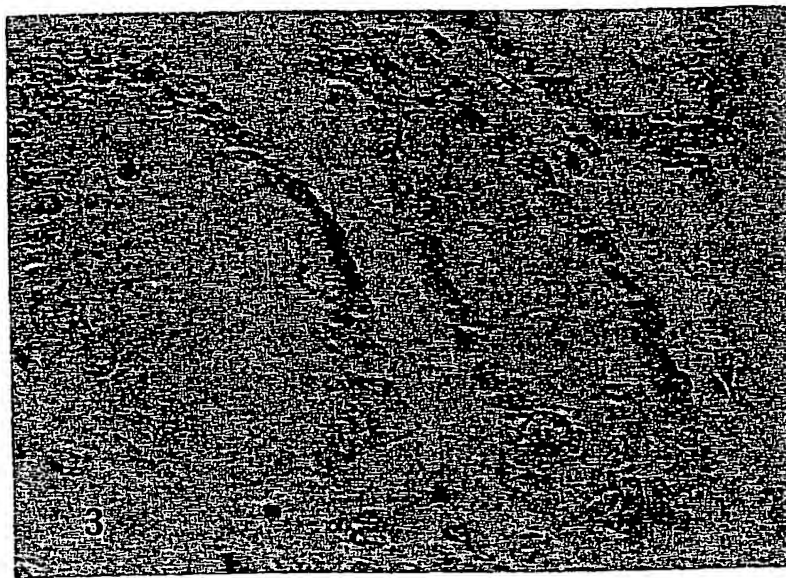


FIG.5C



LISTE DE SEQUENCES

<110> INSERM
SCRAS

<120> acides nucléiques codant pour des peptides possédant
l'activité biologique de la sorbine

<130> BFF 98/555

<140>

<141>

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 474

<212> ADN

<213> porc

<400> 1

```
atgagagcag.caacaccttt gcagacagtt gaccggccga aggactggta caagaccatg 60
tttaagcaaa tccacatggt gcacaagcca gatgatgaca cagacatgta taataactcct 120
tatacatata atgcaggcct gtacaactca cctacagtg ctcagtcaca tctgctgcc 180
aagaccacaga cctacagacc cctctccaaa agccactctg acaatggcac cgacgccttt 240
aaggatgctt cctcacctgt cctccccca catgttcctc ctccagtccc acctctgcga 300
ccaagagatc ggtcttcaac agaaaagcat gactgggatc ctccagacag aaaagtggac 360
acgagaaaat ttcgatcgga gccacggtct atttttgaat acgagcctgg gaagtcaccc 420
atcctgcagc acgaacgacc cgtcacgaaa ccgcaagcag ggcgccgtaa ggtc 474
```

<210> 2

<211> 153

<212> PRT

<213> porc

<220>

<221> MOD_RES

<222> (153)

<223> AMIDATION

<400> 2

```
Met Arg Ala Ala Thr Pro Leu Gln Thr Val Asp Arg Pro Lys Asp Trp
  1           5           10          15

Tyr Lys Thr Met Phe Lys Gln Ile His Met Val His Lys Pro Asp Asp
      20           25           30

Asp Thr Asp Met Tyr Asn Thr Pro Tyr Thr Tyr Asn Ala Gly Leu Tyr
      35           40           45

Asn Ser Pro Tyr Ser Ala Gln Ser His Pro Ala Ala Lys Thr Gln Thr
      50           55           60

Tyr Arg Pro Leu Ser Lys Ser His Ser Asp Asn Gly Thr Asp Ala Phe
      65           70           75           80

Lys Asp Ala Ser Ser Pro Val Pro Pro Pro His Val Pro Pro Pro Val
```



85

90

95

Pro Pro Leu Arg Pro Arg Asp Arg Ser Ser Thr Glu Lys His Asp Trp
 100 105 110

Asp Pro Pro Asp Arg Lys Val Asp Thr Arg Lys Phe Arg Ser Glu Pro
 115 120 125

Arg Ser Ile Phe Glu Tyr Glu Pro Gly Lys Ser Ser Ile Leu Gln His
 130 135 140

Glu Arg Pro Val Thr Lys Pro Gln Ala
 145 150

<210> 3
 <211> 492
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 atgaaagcaa caacaccttt gcagacagtc gaccggccca aggactggta caagacgatg 60
 tttaagcaaa ttcacatggt gcacaagccg gatgatgaca cagacatgta taatactcct 120
 acacctcaca tgaaatatac atacaatgca ggtctgtaca acccacccta cagtgtctcag 180
 tcacaccctg ctgcaaagac ccaaaccctac agacctcttt ccaaaagcca ctccgacaac 240
 agccccaatg cctttaagga tgcgtcctcc ccagtgcctc cccacatgt tccacctcca 300
 gtcccgccgc ttcgaccaag agatcgggtc tcaacagaaa agcatgactg ggatcctcca 360
 gacagaaaag tggacacaag aaatttcggg tctgagccaa ggagtatttt tgaatacgag 420
 cctgggaagt catccatcct gcagcacgaa cgaccggtca cgaaaccgca agcagggcgc 480
 cgtgataagt cc 492

<210> 4
 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (158)
 <223> AMIDATION

<400> 4
 Met Lys Ala Thr Thr Pro Leu Gln Thr Val Asp Arg Pro Lys Asp Trp
 1 5 10 15

Tyr Lys Thr Met Phe Lys Gln Ile His Met Val His Lys Pro Asp Asp
 20 25 30

Asp Thr Asp Met Tyr Asn Thr Pro Thr Pro His Met Lys Tyr Thr Tyr
 35 40 45

Asn Ala Gly Leu Tyr Asn Pro Pro Tyr Ser Ala Gln Ser His Pro Ala
 50 55 60

Ala Lys Thr Gln Thr Tyr Arg Pro Leu Ser Lys Ser His Ser Asp Asn
 65 70 75 80

Ser Pro Asn Ala Phe Lys Asp Ala Ser Ser Pro Val Pro Pro Pro His



85

90

95

Val Pro Pro Pro Val Pro Pro Leu Arg Pro Arg Asp Arg Ser Ser Thr
100 105 110

Glu Lys His Asp Trp Asp Pro Pro Asp Arg Lys Val Asp Thr Arg Asn
115 120 125

Phe Gly Ser Glu Pro Arg Ser Ile Phe Glu Tyr Glu Pro Gly Lys Ser
130 135 140

Ser Ile Leu Gln His Glu Arg Pro Val Thr Lys Pro Gln Ala
145 150 155

<210> 5

<211> 1794

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 5

```

atgaaagcaa caacaccttt gcagacagtc gaccggccca aggactggta caagacgatg 60
tttaagcaaa ttcacatggt gcacaagccg gatgatgaca cagacatgta taataactcct 120
acacctcaca tgaaatatac atacaatgca ggtctgtaca acccacccta cagtgtcag 180
tcacaccctg ctgcaaagac ccaaacctac agacctcttt ccaaagcca ctccgacaac 240
agccccaatg cctttaagga tgcgtcctcc ccagtgcctc ccccatgtg tccacctcca 300
gtcccgccgc ttcgaccaag agatcgggtc tcaacagaaa agcatgactg ggatcctcca 360
gacagaaaag tggacacaag aaatttcggg tctgagccaa ggagtatttt tgaatacgag 420
cctgggaagt catccatcct gcagcacgaa cgacctgtc accagtcttc catagacaga 480
agcttggaag gaccagcag ctctgcaagc atggcgggtg actttagaaa acggaggaag 540
agtgaacctg cagtgggccc gccaggggc ttgggggatc acagttcaag caggaccagc 600
cccggccggg cagacctccc aggatcaagt tccaccttta ccacgtcttt cattagttct 660
tctccttctt ctccctcgag agcacaaggt ggggatgata gcaaatgtg tccgcccctt 720
tgcagttact cggggctcaa tggctcgccc tctagttagt tagagtgtg cggcgttat 780
agaaggcact tggacgtccc ccaggactct caaagggccca tcactttcaa gaacggctgg 840
caaatggccc ggcaaatgc agagatctgg agtagcactg aagaggcggg tcccccaaa 900
atcaaatcac gaagctgtga cgatctcctg aatgatgact gcggcagctt ccagaccct 960
aaaaccaagt cagaaagcat gggttctctg ttatgtgacg aaggctccaa agagagcgac 1020
cccatgacgt ggacttcccc ctacatcccg gaagtgtgag ggaacagcag agaattcatg 1080
tttaagcaaa tggatattcg tggaatctct ggatggagga ccattttgga aagtgtctaaa 1140
ggaatatcta taatgagtga ggaatctatg agaaagatgt aaagtgtgag acgtaaattt 1200
tttggttttag tagatgatca ctgattttaaa tgtataacag agtagatgcc cccccctca 1260
aaaacgcata accccccctt taccctgaca tttagctttg aatatgcaca aaatagtttg 1320
tggttagaat agaaccctat gtctgaaagt atatgtgttg ggatttcac ccatatatgg 1380
tggtagccgc caactcagag ataggtcggt ctgtagatt ctcaacaata aaatgtataa 1440
cacaagcttg aattcatgtt taagcaata aaaataatgt gggagactgg acagaggtca 1500
gggacccag ggtgccaagt gtagctcaga gtcaccattg gtgaatcgct tcatctccat 1560
gtggaactaa atgcaactaa gtgatttctt aggctttccc cagtcattct tagtgaaaat 1620
atggacttcc cacatcaatt ctgagtcact ttcttcccac ctggaatgat taccattttt 1680
ctcatagtca gtgtatgcag cagcatatac cctcatttgc ctttgggtac attcctgagt 1740
caaatgtat aacacaaggt cacgaaaccg caagcagggc gccgtgataa gtcc 1794

```

<210> 6

<211> 21

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 6

cccgtcacga aaccgcaagc a

21

<210> 7
<211> 30
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 7
cacgaacgac ccgtcacgaa accgcaagca

30

<210> 8
<211> 120
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 8
cctccagaca gaaaagtgga cacaagaaat ttcgggtctg agccaaggag tatttttgaa 60
tacgagcctg ggaagtcac catcctgcag cacgaacgac ccgtcacgaa accgcaagca 120

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)
<223> AMIDATION

<400> 9
Pro Val Thr Lys Pro Gln Ala
1 5

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MOD_RES
<222> (10)
<223> AMIDATION

<400> 10
His Glu Arg Pro Val Thr Lys Pro Gln Ala
1 5 10

<210> 11
<211> 40
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>



<221> MOD_RES
<222> (40)
<223> AMIDATION

<400> 11
Pro Pro Asp Arg Lys Val Asp Thr Arg Asn Phe Gly Ser Glu Pro Arg
1 5 10 15
Ser Ile Phe Glu Tyr Glu Pro Gly Lys Ser Ser Ile Leu Gln His Glu
20 25 30
Arg Pro Val Thr Lys Pro Gln Ala
35 40

<210> 12
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorces
utilisées pour les RT-PCR

<400> 12
aargayacnt ayaarac

17

<210> 13
<211> 17
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorces
utilisées pour les RT-PCR

<400> 13
cggccgaagg actggta

17

<210> 14
<211> 18
<212> ADN
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: amorces
utilisées pour les RT-PCR

<400> 14
acaagccgag atgatgac

18

<210> 15
<211> 22
<212> ADN
<213> Séquence artificielle



<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorces
utilisées pour les RT-PCR

<400> 15

gtcttcaaca gaaaagcatg ac

22

<210> 16

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorces
utilisées pour les RT-PCR

<400> 16

ggncgytcrt gytgyag

17

<210> 17

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorces
utilisées pour les RT-PCR

<400> 17

ggatcccagt catgctt

17

<210> 18

<211> 17

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorces
utilisées pour les RT-PCR

<400> 18

tggatgactt cccaggc

17

<210> 19

<211> 48

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorces
utilisées pour les RT-PCR

<400> 19

gggtcgcttcg tgctgcagga tggatgactt cccaggctcg tattcaaa

48



<210> 20

<211> 21

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle: amorces
utilisées pour les RT-PCR

<400> 20

tgcttgcggt ttcgtgacgg g

21



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/FR 00/02076

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C12N15/11 C12Q1/68 C07K14/47 C07K16/18
A61K38/17 A61K48/00 G01N33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K C12N C12Q A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 89 06241 A (INST NAT SANTE RECH MED) 13 July 1989 (1989-07-13) cited in the application claims 1-14; examples 1-4	1-13
X	HILLIER ET AL.: "The WashU-Merck EST Project" EMBL DATABASE, ACC NO: H54590, 22 September 1995 (1995-09-22), XP002136341 abstract	1-13
X	HILLIER ET AL.: "Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags" EMBL DATABASE, ACC NO: AA142922, 14 December 1996 (1996-12-14), XP002136342 abstract	1-13
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 December 2000

Date of mailing of the international search report

28/12/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

van Klompenburg, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 00/02076

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WANG ET AL.: "ArgBP2, a multiple Src Homology 3 domain-containing, Arg/Abl-interacting protein, is phosphorylated in v-Abl-transformed cells and localized in stress fibers and cardiocytic Z-disks" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 28, 11 July 1997 (1997-07-11), pages 17542-17550, XP002136343 page 17545, column 1; figure 1 -& WANG ET AL.: "Homo sapiens Arg/Abl-interacting protein ArgBP2 mRNA" EMBL DATABASE ACC NO: AF049885, 16 March 1998 (1998-03-16), XP002136344 abstract	1-13
X	WO 99 22243 A (ENDRESS GREGORY A ;FLORENCE KIMBERLY A (US); HUMAN GENOME SCIENCES) 6 May 1999 (1999-05-06) SEQ ID NO: 60 claims 1-23	1-13
X	WO 99 06548 A (LACROIX BRUNO ;DUCLERT AYMERIC (FR); GENSET (FR); DUMAS MILNE EDWA) 11 February 1999 (1999-02-11) SEQ ID NO: 178 claims 1-37	1-13
X	WO 99 06553 A (LACROIX BRUNO ;DUCLERT AYMERIC (FR); GENSET (FR); DUMAS MILNE EDWA) 11 February 1999 (1999-02-11) SEQ ID NO: 159 claims 1-37	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Inten. Application No

PCT/FR 00/02076

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8906241 A	13-07-1989	FR 2601020 A AT 82754 T DE 3876240 D DE 3876240 T EP 0348399 A	08-01-1988 15-12-1992 07-01-1993 03-06-1993 03-01-1990
WO 9922243 A	06-05-1999	AU 1273499 A EP 1042674 A AU 1118499 A WO 9921575 A	17-05-1999 11-10-2000 17-05-1999 06-05-1999
WO 9906548 A	11-02-1999	AU 8554798 A EP 1000146 A	22-02-1999 17-05-2000
WO 9906553 A	11-02-1999	AU 8555698 A EP 1000151 A	22-02-1999 17-05-2000



RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No

PCT/FR 00/02076

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE					
CIB 7	C12N15/12	C12N15/11	C12Q1/68	C07K14/47	C07K16/18
	A61K38/17	A61K48/00	G01N33/53		

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C07K C12N C12Q A61K G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, STRAND

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 89 06241 A (INST NAT SANTE RECH MED) 13 juillet 1989 (1989-07-13) cité dans la demande revendications 1-14; exemples 1-4 ---	1-13
X	HILLIER ET AL.: "The WashU-Merck EST Project" EMBL DATABASE, ACC NO: H54590, 22 septembre 1995 (1995-09-22), XP002136341 abrégé ---	1-13
X	HILLIER ET AL.: "Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags" EMBL DATABASE, ACC NO: AA142922, 14 décembre 1996 (1996-12-14), XP002136342 abrégé ---	1-13

-/--

X Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

X Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent: l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *G* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

20 décembre 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/12/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

van Klompenburg, W

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Donnée internationale No

PCT/FR 00/02076

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>WANG ET AL.: "ArgBP2, a multiple Src Homology 3 domain-containing, Arg/Abl-interacting protein, is phosphorylated in v-Abl-transformed cells and localized in stress fibers and cardiocytic Z-disks"</p> <p>THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 272, no. 28, 11 juillet 1997 (1997-07-11), pages 17542-17550, XP002136343</p> <p>page 17545, colonne 1; figure 1</p> <p>-& WANG ET AL.: "Homo sapiens Arg/Abl-interacting protein ArgBP2 mRNA"</p> <p>EMBL DATABASE ACC NO: AF049885, 16 mars 1998 (1998-03-16), XP002136344 abrégé</p>	1-13
X	<p>WO 99 22243 A (ENDRESS GREGORY A ; FLORENCE KIMBERLY A (US); HUMAN GENOME SCIENCES) 6 mai 1999 (1999-05-06)</p> <p>SEQ ID NO: 60</p> <p>revendications 1-23</p>	1-13
X	<p>WO 99 06548 A (LACROIX BRUNO ; DUCLERT AYMERIC (FR); GENSET (FR); DUMAS MILNE EDWA) 11 février 1999 (1999-02-11)</p> <p>SEQ ID NO: 178</p> <p>revendications 1-37</p>	1-13
X	<p>WO 99 06553 A (LACROIX BRUNO ; DUCLERT AYMERIC (FR); GENSET (FR); DUMAS MILNE EDWA) 11 février 1999 (1999-02-11)</p> <p>SEQ ID NO: 159</p> <p>revendications 1-37</p>	1-13

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/FR 00/02076

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 8906241 A	13-07-1989	FR 2601020 A	08-01-1988
		AT 82754 T	15-12-1992
		DE 3876240 D	07-01-1993
		DE 3876240 T	03-06-1993
		EP 0348399 A	03-01-1990
WO 9922243 A	06-05-1999	AU 1273499 A	17-05-1999
		EP 1042674 A	11-10-2000
		AU 1118499 A	17-05-1999
		WO 9921575 A	06-05-1999
WO 9906548 A	11-02-1999	AU 8554798 A	22-02-1999
		EP 1000146 A	17-05-2000
WO 9906553 A	11-02-1999	AU 8555698 A	22-02-1999
		EP 1000151 A	17-05-2000



PCT

REC'D 16 NOV 2001

WIPO

PCT

RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire BET 00/0696	POUR SUITE A DONNER voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/02076	Date du dépôt international (jour/mois/année) 19/07/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 20/07/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB C12N15/12		
Déposant INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA ... et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 5 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
 - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 3 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☐ Priorité
- III ☐ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☐ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☐ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 08/12/2000	Date d'achèvement du présent rapport 14.11.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Schwachtgen, J-L N° de téléphone +49 89 2399 8933 



**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02076

I. Base du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

Description, pages:

1-40 version initiale

Revendications, N°:

1-13 reçue(s) avec télécopie du 25/10/2001

Dessins, feuilles:

1/5-5/5 version initiale

Partie de la demande réservée au listage des séquences, pages:

1-7, telles que initialement déposées

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☒ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☒ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.



**RAPPORT D'EXAMEN
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/02076

- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
☐ des revendications, n^{os} :
☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-13
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications
	Non : Revendications 1-13
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-13
	Non : Revendications

2. Citations et explications
voir feuille séparée



Concernant le point V

Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration

Il est fait référence aux documents suivants:

D1: WO 89 06241 A (INST NAT SANTE RECH MED) 13 juillet 1989 (1989-07-13) cité dans la demande

D2: HILLIER ET AL.: 'The WashU-Merck EST Project' EMBL DATABASE, ACC NO: H54590, 22 septembre 1995 (1995-09-22), XP002136341

D3: HILLIER ET AL.: 'Generation and analysis of 280,000 human expressed sequence tags' EMBL DATABASE, ACC NO: AA142922, 14 décembre 1996 (1996-12-14), XP002136342

2. Le document D1 révèle un polypeptide purifié d'origine porcine possédant l'activité biologique de la sorbine (exemple 1, revendication 1) et le procédé d'obtention du polypeptide en question. D1 révèle aussi une composition pharmaceutique comprenant la sorbine porcine et l'utilisation qui pourrait en être faite dans une application thérapeutique (exemple 4). Le document D1 montre aussi la voie pour arriver à la production de sorbine par génie génétique (exemple 3), même si les séquences nucléotidiques en question ne sont pas décrites.
3. La séquence protéique de la sorbine porcine révélée dans D1 diffère de la séquence SEQ ID No: 2 de la sorbine porcine de la présente demande au niveau de trois acides aminés en positions 16, 35 et 112. Comme il n'est pas possible de déterminer a posteriori si ces différences résultent de mutations ou de simples erreurs de séquençage, il résulte que l'objet des revendications 6 et 7 sont formellement nouvelles (Article 33(2) PCT).



4. La présente demande ne remplit pas les critères de l'article 33(3) PCT concernant l'activité inventive.

Il paraît évident que l'homme du métier, connaissant le document D1, aurait pu cloner le gène de la sorbine porcine et humaine, correspondant à l'objet de la revendication 1 de la présente demande et exprimer la protéine correspondante sans intervention d'activité inventive (Article 33(3) PCT). Ceci est d'autant plus vrai que deux fragments EST du gène de la sorbine étaient connus avant la date de priorité de la présente demande et que les différences de trois acides aminés entre la séquence connue et la séquence de la présente demande n'ont pas d'influence surprenantes sur l'activité de la sorbine.

La même objection est valable pour l'objet des revendications 2 à 13.



REVENDICATIONS

1. Acide nucléique codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, ledit acide nucléique comprenant la séquence nucléotidique choisie parmi :

- a) la séquence SEQ ID n° 1 ;
- b) la séquence SEQ ID n° 3 ;
- c) la séquence SEQ ID n° 5 ;
- d) une séquence nucléotidique homologue de la séquence SEQ ID n° 1, n° 3 ou n° 5 ; et
- e) au moins un fragment nucléotidique desdites séquences a), b), c) ou d).

2. Acide nucléique selon la revendication 1, ledit acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique choisie parmi la séquence SEQ ID n° 6 à 8 et une séquence nucléotidique homologue de la séquence SEQ ID n° 6 à 8.

3. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant une séquence nucléotidique telle que définie dans l'une des revendications 1 ou 2.

4. Cellule hôte transformée par le vecteur selon la revendication 3.

5. Procédé de production de peptide recombinant possédant l'activité biologique de la sorbine, ledit procédé comprenant les étapes consistant à :

i) insérer une séquence nucléotidique telle que définie dans l'une des revendications 1 ou 2 dans un vecteur d'expression, ladite séquence nucléotidique étant liée de manière opérante avec des éléments permettant la régulation de son expression ;

ii) transformer une cellule hôte avec le vecteur ainsi obtenu ;



iii) cultiver ladite cellule hôte dans des conditions permettant l'expression de ladite séquence nucléotidique ;

iv) recueillir le peptide recombinant exprimé ;

v) éventuellement purifier ledit peptide ;

vi) éventuellement procéder à une amidation du peptide produit.

6. Peptide recombinant isolé obtenu par le procédé selon la revendication 5.

7. Peptide recombinant possédant l'activité biologique de la sorbine et comprenant la séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID n° 2, SEQ ID n° 4 et SEQ ID n° 11.

8. Composition pharmaceutique comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 1 ou 2 ou un peptide selon l'une des revendications 6 ou 7.

9. Oligonucléotides comprenant les séquences SEQ ID n° 12 à SEQ ID n° 20 ou leurs séquences complémentaires.

10. Procédé de détection de l'expression de la sorbine dans un échantillon cellulaire ou tissulaire, comprenant les étapes consistant à:

- préparer l'ARN dudit échantillon ;

- mettre en contact ledit ARN obtenu avec une sonde ayant une séquence nucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement avec un acide nucléique codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, tel que défini à la revendication 1 ;

- détecter la présence d'ARNm hybridant avec cette sonde, indicatrice de l'expression d'un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine dans l'échantillon.



11. Procédé de détection *in vitro* de l'expression de la sorbine dans des cellules ou un tissu par hybridation *in situ*, comprenant les étapes consistant à :

- mettre en contact lesdites cellules ou ledit tissu avec une sonde ayant une séquence nucléotidique capable de s'hybrider spécifiquement avec un acide nucléique codant pour un peptide possédant l'activité biologique de la sorbine, tel que défini dans la revendication 1 ;

- détecter la présence d'ARNm hybridant avec cette sonde, indicatrice de l'expression du peptide possédant l'activité biologique de la sorbine.

12. Anticorps monoclonal ou polyclonal dirigé spécifiquement contre la sorbine humaine, ou fragment dudit anticorps capable de se lier spécifiquement à la sorbine humaine.

13. Procédé de détection et/ou de dosage immunologique de la sorbine humaine dans un échantillon biologique dans lequel :

- i) on met en contact ledit échantillon biologique avec un anticorps tel que défini dans la revendication 12, marqué de manière détectable ;

- ii) on observe la formation d'un complexe anticorps-sorbine humaine, indicateur de la présence de sorbine humaine dans ledit échantillon.

